(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190266 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.30

(22) Дата подачи заявки
2013.11.14

(51) Int. Cl. ***C07K 16/18*** (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ ЗАХВАТЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ

(31) **61/726,040**
(32) **2012.11.14**
(33) **US**
(62) **201590928; 2013.11.14**

(71) Заявитель:
РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Дешпанде Дипали, Чэнь Ган, Бураков Дарья, Фэнлд Джеймс, Олдрич Томас, Камат Вишал (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Обеспечиваются рекомбинантные захватывающие белки клеточной поверхности и детекторные молекулы, которые применимы для выделения и детектирования клеток, которые продуцируют секретируемый гетеродимерный белок, представляющий интерес (POI), который содержит CH3-домен иммуноглобулина и/или замещенный CH3-домен. Также обеспечиваются рекомбинантные захватывающие белки клеточной поверхности и детекторные молекулы, которые позволяют выделить и детектировать биспецифические антитела. Настоящим изобретением также обеспечиваются рекомбинантные антигенсвязывающие белки, которые способны распознавать и связывать представляющие интерес белки, которые содержат CH3-домен и/или модифицированный CH3-домен, такой как CH3-домен с аминокислотными заменами в H95 и Y96 (IMGT) или без них.

202190266 A1

202190266 A1

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ЗАХВАТЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Эта заявка испрашивает согласно § 119(e) раздела 35 свода законов США приоритет предварительной заявки на патент США № 61/726040, поданной 14 ноября 2012 года, которая при этом включена сюда посредством ссылки в ее полном объеме.

Список последовательностей

Эта заявка включает посредством ссылки список последовательностей, представленный в машиночитаемой форме как файл 8600WO_ST25.txt, созданный 12 ноября 2013 года (86267 байтов).

Область техники

Область настоящего изобретения относится к рекомбинантным захватывающим белкам клеточной поверхности и способам идентификации, выделения клеток, продуцирующих секретируемые белки, которые являются гетеродимерами, например, биспецифическими белками, и обогащения ими. Конкретнее, захватывающие белки клеточной поверхности и способы позволяют быстро и эффективно выделить клеточные линии, продуцирующие рекомбинантные антитела на высоком уровне экспрессии, в том числе, быстро и эффективно выделить специфические гибридомы и клетки, секретирующие гетеродимерные белки, например, биспецифические антитела, тем самым обогатить гетеродимерным типом молекул (биспецифической молекулой) и преимущественно отделить гетеродимерный тип от гомодимерного типа молекул.

Способы известного уровня техники для экспрессии представляющего интерес гена (GOI) в клетке-хозяине известны. Вкратце, экспрессионный вектор, содержащий GOI, вводят в клетку. После стабильной интеграции стандартные методы выделения клеток с высоким уровнем экспрессии включают сбор пулов клеток, отбор вручную колоний с чашек, выделение отдельных клеток с помощью предельного разведения или другие способы, известные в данной области техники. Пулы или отдельные

клоны затем размножают и подвергают скринингу в отношении продукции представляющего интерес белка (POI) путем прямого измерения активности POI, путем иммунологического детектирования POI или с помощью других подходящих методов. Эти процедуры являются трудоемкими, неэффективными, дорогостоящими, и число клонов, которое можно проанализировать, обычно ограничивается несколькими сотнями.

Большая степень неоднородности в экспрессии белков клетками после стабильной интеграции предписывает скрининг множества отдельных клонов, чтобы идентифицировать редкое событие интеграции, которое приводит к стабильной линии клеток с высоким уровнем экспрессии - продукции. Это предписание вызывает необходимость в способах, которые позволяют быстро идентифицировать и выделить клетки, показывающие самый высокий уровень продукции белка. Кроме того, при сборе пулов клонов или отобранных вручную колоний возникает угроза потери клеток с высокими уровнями экспрессии, которые часто растут более медленно, по отношению к более быстро растущим клеткам с низким уровнем экспрессии. Таким образом, существует потребность в способах, которые позволяют быстро скринировать и выделить отдельные клетки, способные к экспрессии на высоком уровне секретируемого POI. Если POI содержит более одной субъединицы, необходимо осуществить отбор преимущественно в пользу желаемого гетеродимерного типа относительно гомодимерного типа.

Включение проточной цитометрии в способы, используемые для выделения стабильных экспрессирующих линий клеток, увеличило возможность скрининга большого числа отдельных клонов, однако имеющиеся в распоряжении в настоящее время способы остаются несоответствующими по различным причинам. Диффузия POI между клетками с различными характеристиками также была проблемой.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение описывает способ скрининга с высокой пропускной способностью для быстрого выделения тех клеток, которые секретируют белок, посредством прямого скрининга в отношении представляющего интерес белка (POI). Это изобретение также обеспечивает возможность удобного слежения за экспрессией

POI на основе одной клетки в ходе процесса производства. Кроме того, эта технология может быть непосредственно применена к скринингу продуцирующих биспецифические антитела клеток, или любой клетки, продуцирующей гетеродимерный белок. Эта технология также может быть непосредственно применена к скринингу клеток, продуцирующих модифицированные Т-клеточные рецепторы, таких как, например, клетки, которые продуцируют растворимые формы Т-клеточных рецепторов.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ детектирования и выделения клеток, которые продуцируют секретируемый белок, представляющий интерес, (POI), включающий: a) конструирование молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует захватывающую молекулу клеточной поверхности, способную к связыванию с POI; b) трансфекцию клетки, экспрессирующей POI, молекулой нуклеиновой кислоты стадии a); c) детектирование представленного на поверхности POI посредством приведения клеток в контакт с детекторной молекулой, причем детекторная молекула связывается с POI; и d) выделение клетки на основе детекторной молекулы.

В различных вариантах осуществления представляющий интерес белок включает лиганд, растворимый рецепторный белок, фактор роста, слитый белок, антитело, биспецифическое антитело, Fab, одноцепочечное антитело (ScFv) или его фрагмент. Когда представляющий интерес белок представляет собой антитело, антитело выбирают из группы, состоящей из IgM, IgG, IgA, IgD или IgE, а также их различных подтипов или вариантов. В конкретном варианте осуществления антитело представляет собой антитело против DII4, антитело против ErbB3, антитело против EGFR, биспецифическое, направленное против ErbB3/EGFR антитело с двойной специфичностью или антитело против рецептора IL-6.

В более конкретных вариантах осуществления представляющий интерес белок представляет собой фактор роста, выбираемый из группы, состоящей из интерлейкина (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), эритропоэтина, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиопоэтина 1 (Ang-1),

ангиопоэтина 2 (Ang-2), TNF, интерферона-гамма, GM-CSF, TGFβ и рецептора TNF.

В различных вариантах осуществления представляющий интерес белок включает вариабельный домен Т-клеточного рецептора. В конкретных вариантах осуществления представляющий интерес белок представляет собой растворимый Т-клеточный рецептор (sTCR) или белок, включающий экстраклеточный домен Т-клеточного рецептора, слитый с Fc (TCR-Fc). В конкретном варианте осуществления Fc является Fc человека. В различных вариантах осуществления белок включает вариабельный домен экстраклеточного домена Т-клеточного рецептора. В различных вариантах осуществления белок включает вариабельный домен и константную область экстраклеточного домена Т-клеточного рецептора.

Нуклеиновая кислота, которая кодирует представляющий интерес белок, может быть из любого источника, встречающейся в природе или сконструированной с помощью рекомбинантной технологии, и может быть выбрана из библиотеки ДНК.

В различных вариантах осуществления захватывающая молекула клеточной поверхности представляет собой лиганд-специфический рецептор, рецептор-специфический лиганд, антителосвязывающий белок, антитело или фрагмент антитела, такой как ScFv, или пептид. Когда захватывающей молекулой является пептид, пептид может быть выделен из библиотеки фагового дисплея. В более конкретных вариантах осуществления захватывающей молекулой может быть Ang1, Ang2, VEGF, Tie1, Tie2, VEGFRI (Flt1), VEGFRII (Flk1 или KDR), CNTF, CNTFR-α, компоненты рецепторов цитокинов, слияния двух или более компонентов цитокиновых рецепторов, или его фрагмент. Когда захватывающей молекулой является антителосвязывающий белок, антителосвязывающим белком может быть Fc-рецептор, антитело против иммуноглобулина, ScFv против иммуноглобулина (анти-Ig), направленное против Fc антитело, направленное против Fc* антитело, белок A, белок L, белок G, белок H или их функциональные фрагменты. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления захватывающая молекула представляет собой слитый белок, включающий антиген, белок A

или ScFv против Ig, слитый с трансмембранным доменом или линкер в виде GPI (гликозилфосфатидилинозитола).

В различных вариантах осуществления, в которых представляющий интерес белок включает вариабельный домен Т-клеточного рецептора, захватывающая молекула клеточной поверхности включает Fc-рецептор или связанный с мембраной антиген, который может распознаваться вариабельным доменом Т-клеточного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления, в которых представляющий интерес белок представляет собой гетеродимерный белок, такой как гетеродимерный белок, имеющий первую субъединицу и вторую субъединицу, захватывающая молекула клеточной поверхности включает антиген, белок А или ScFv, способный связываться с первой субъединицей, а не второй субъединицей, или такая захватывающая молекула клеточной поверхности связывает вторую субъединицу, а не первую субъединицу.

В различных вариантах осуществления, в которых представляющий интерес белок представляет собой IgG1, IgG2, IgG4 или биспецифическое антитело, имеющее один CH3-домен, включающий мутацию, которая отменяет связывания с белком А, и другой CH3-домен, способный к связыванию с белком А; или слитый белок, включающий Fc-фрагмент из IgG, IgG2, IgG4 или Fc-фрагмент, имеющий один CH3-домен, включающий мутацию, которая отменяет связывания с белком А, и другой CH3-домен, способный к связыванию с белком А, захватывающая молекула клеточной поверхности включает ScFv против иммуноглобулина, такое как анти-Fc или анти-Fc* ScFv.

В отдельных вариантах осуществления способы настоящего изобретения, кроме того, включают мембранный якорь, который служит для закрепления к клеточной мембране POI, обращенного наружу от клетки, и, таким образом, функционирует в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности. В конкретных вариантах осуществления мембранный якорь представляет собой трансмембранный якорь или GPI-линкер. Примеры конкретных трансмембранных якорей включает трансмембранный домен Fc-

рецептора, такой как трансмембранный домен FcγRI человека, пример которого приведен в SEQ ID NO: 17. Мембранный якорь может быть природным по отношению к клетке, рекомбинантным или синтетическим.

В различных вариантах осуществления представляющий интерес белок включает вариабельную область Т-клеточного рецептора, а захватывающая молекула клеточной поверхности включает связанный с мембраной антиген. В конкретном варианте осуществления связанный с мембраной антиген представляет собой рекомбинантный слитый белок, включающий антиген, который может распознаваться вариабельной областью Т-клеточного рецептора, слитый с мембранным якорем, причем антиген связан с клеточной поверхностью. В конкретном варианте осуществления рекомбинантный слитый белок включает антиген, слитый с трансмембранным якорем или GPI-линкером. В другом конкретном варианте осуществления захватывающая молекула клеточной поверхности включает рекомбинантный слитый белок, включающий мембранный якорь и антиген, способный связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости (MHC), в том числе, но без ограничения, например, опухолевые антигены и собственные белки трансформированного фенотипа.

В дополнительных вариантах осуществления сигнальная последовательность добавлена к амино-концу POI, так что этот белок переносится к клеточной поверхности и функционирует в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности. Сигнальная последовательность может быть природной по отношению к клетке, рекомбинантной или синтетической.

В различных вариантах осуществления блокирующую молекулу, которая связывается с захватывающей молекулой клеточной поверхности, добавляют для уменьшения диффузии POI из экспрессирующей клетки в соседнюю клетку. В другом варианте осуществления диффузию POI из экспрессирующей клетки в соседнюю клетку и ее адгезию к этой клетке уменьшают за счет увеличения вязкости сред.

Клеткой, выделенной с использованием способов настоящего

изобретения, может быть продуцирующая антитела клетка, слитая с иммортализованной клеткой. В более конкретных вариантах осуществления продуцирующей антитела клеткой является В-клетка или ее производное. Производным В-клетки может быть плазматическая клетка, гибридома, миелома или рекомбинантная клетка.

Кроме того, способы настоящего изобретению могут использоваться для идентификации В-клеток и их производных, или гибридом, которые экспрессируют секретируемые антитела с желаемой специфичностью, аффинностью или изотипом. Настоящее изобретение может также использоваться для выделения клеток, которые экспрессируют желательные уровни антитела или фрагментов антител.

Детектирование клеток с представленным на поверхности POI может быть достигнуто за счет использования любой молекулы, способной прямо или косвенно связываться с представленным на поверхности POI. Такие детекторные молекулы могут способствовать детектированию и/или выделению клеток, представляющих POI на поверхности. В одном варианте осуществления используют две молекулы, которые связываются друг с другом и являются по-разному меченными. Детектирование и/или выделение может быть осуществлено с помощью стандартных методов, известных в данной области техники.

В другом аспекте признаком настоящего изобретения является способ детектирования и выделения клеток, которые продуцируют секретируемый представляющий интерес белок (POI), включающий: a) трансфекцию клетки нуклеиновой кислотой, которая кодирует захватывающую молекулу клеточной поверхности, причем захватывающая молекула клеточной поверхности способна связываться с POI; b) трансфекцию клетки со стадии a) одновременно или последовательно второй нуклеиновой кислотой, которая кодирует POI, причем POI экспрессируется и секретируется; c) детектирование представленного на поверхности POI посредством приведения клетки в контакт с детекторной молекулой, которая связывает POI; и d) выделение клетки на основе детекторной молекулы.

В другом аспекте признаком настоящего изобретения является способ детектирования и выделения клеток, которые продуцируют POI, включающий: a) детектирование клетки, которая экспрессирует захватывающую молекулу клеточной поверхности с высоким выходом; b) выделение и культивирование клетки, детектированной на стадии (a); c) трансфекцию клетки со стадии (b) нуклеиновой кислотой, кодирующей POI, причем POI является секретируемым; d) детектирование представленного на поверхности POI посредством приведения клеток в контакт с детекторной молекулой, которая связывает POI; и e) выделение клетки на основе детекторной молекулы.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ детектирования и выделения клеток, которые продуцируют представляющий интерес белок (POI) на высоким уровнях, включающий: a) трансфекцию клеток нуклеиновой кислотой, кодирующей такую захватывающую молекулу клеточной поверхности, которая способна связываться с POI, причем клетка экспрессирует POI; b) детектирование клетки со стадии (a), которая экспрессирует указанную захватывающую молекулу клеточной поверхности с высоким выходом; c) выделение и культивирование клетки с высоким выходом; d) детектирование представленного на поверхности POI посредством приведения клетки в контакт с детекторной молекулой, которая связывает POI; и e) выделение детектированной клетки.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ детектирования и выделения клеток, которые продуцируют гетеродимерный белок на высоких уровнях, включающий: (a) трансфекцию клеток нуклеиновой кислотой, которая кодирует захватывающую молекулу клеточной поверхности, которая представляет собой слитый белок, включающий мембранный якорный домен, и способна связывать первую субъединицу гетеродимерного белка, причем клетка экспрессирует гетеродимерный белок; (b) детектирование клетки со стадии (a), которая экспрессирует указанную захватывающую молекулу клеточной поверхности с высоким выходом; c) выделение и культивирование клетки, которая экспрессирует захватывающую молекулу клеточной поверхности с

высоким выходом; (d) детектирование гетеродимерного белка на поверхности выделенной и подвергнутой культивированию клетки со стадии (c) с помощью детекторной молекулы, которая связывает вторую субъединицу гетеродимерного белка; и (e) выделение клетки, детектированной на стадии (d), которая содержит детектированный гетеродимерный белок на своей поверхности.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ детектирования и выделения клеток, которые продуцируют иммуноглобулин на высоких уровнях, включающий: (a) трансфекцию клеток нуклеиновой кислотой, которая кодирует захватывающую молекулу клеточной поверхности, способную связывать иммуноглобулин, причем клетка экспрессирует иммуноглобулин; (b) детектирование клетки со стадии (a), которая экспрессирует захватывающую молекулу клеточной поверхности с высоким выходом; (c) выделение и культивирование клетки, которая экспрессирует захватывающую молекулу поверхности с высоким выходом; (d) детектирование иммуноглобулина на поверхности выделенной и подвергнутой культивированию клетки со стадии (c) с помощью детекторной молекулы, которая связывает иммуноглобулин; и (e) выделение клетки, детектированной на стадии (d), которая содержит детектированный иммуноглобулин на своей поверхности.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ детектирования и выделения клеток, которые продуцируют биспецифическое антитело на высоких уровнях, включающий: (a) трансфекцию клеток нуклеиновой кислотой, которая кодирует захватывающую молекулу клеточной поверхности, которая представляет собой слитый белок, включающий мембранный якорный домен, такой как слитый с ScFv белок, и способна связывать биспецифическое антитело, причем клетка экспрессирует биспецифическое антитело; (b) детектирование клетки со стадии (a), которая экспрессирует захватывающую молекулу клеточной поверхности с высоким выходом; (c) выделение и культивирование клетки, которая экспрессирует захватывающую молекулу поверхности с высоким выходом; (d) детектирование биспецифического антитела на поверхности выделенной и подвергнутой культивированию клетки со стадии (c) с помощью

детекторной молекулы, которая связывает биспецифическое антитело; и (e) выделение клетки, детектированной на стадии (d), которая содержит детектированное биспецифическое антитело на своей поверхности.

В другом аспекте обеспечивается способ детектирования клеток, которые продуцируют аффинный агент, который включает вариабельную область Т-клеточного рецептора (TCR), на желаемом уровне.

В другом аспекте обеспечивается способ детектирования клеток, которые продуцируют TCR-Fc на желаемом уровне, включающий: (a) трансфекцию клеток нуклеиновой кислотой, кодирующей Fc-рецептор, способный связываться с TCR-Fc, причем клетка экспрессирует антиген, распознаваемый TCR-Fc; (b) детектирование клетки со стадии (a), которая экспрессирует TCR-Fc с высоким выходом; (c) выделение и культивирование клетки, которая экспрессирует TCR-Fc с высоким выходом; (d) детектирование антигена на поверхности выделенной и подвергнутой культивированию клетки со стадии (c) с помощью детекторной молекулы; и (e) выделение клетки, детектированной на стадии (d), которая содержит детектированный антиген на своей поверхности.

В различных вариантах осуществления TCR выбирают из TCR человека и TCR грызунов, например, TCR крысы, мыши или хомяка. В конкретном варианте осуществления Fc является Fc человека. В другом конкретном варианте осуществления Fc является Fc человека, а Fc-рецептором является Fc-рецептор человека с высоким сродством. В конкретном варианте осуществления Fc-рецептором человека с высоким сродством является FcγRI человека.

В различных вариантах осуществления захватывающим белком клеточной поверхности является связанный с поверхностью антиген. В конкретном варианте осуществления антиген связан с поверхностью в результате слияния с трансмембранным доменом или GPI-линкером.

В некоторых аспектах способа отбора клеток с расширенными

возможностями, которые продуцируют представляющий интерес белок, рекомбинантные антигенсвязывающие белки могут использоваться в качестве захватывающих белков клеточной поверхности (CSCP), детекторных молекул (DM) и/или блокирующих молекул. Таким образом, настоящим изобретением обеспечиваются рекомбинантные антигенсвязывающие белки.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается рекомбинантный антигенсвязывающий белок, который связывается с Fc-доменом IgG1 человека, Fc-доменом IgG2 человека или Fc-домена IgG4 человека, или любым белком, который включает, например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, которая кодирует Fc человека. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный антигенсвязывающий белок связывается с полипептидом с K_D, составляющей менее приблизительно 40 нМ, как определено в анализе с использованием поверхностного плазмонного резонанса.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный антигенсвязывающий белок включает один или более определяющих комплементарность участков (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 15, или вариабельной области легкой цепи (LCVR), имеющей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 16. В одном случае белок включает CDR-1 тяжелой цепи (HCDR-1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, HCDR-2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, HCDR-3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, CDR-1 легкой цепи (LCDR-1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и LCDR-2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях белок включает HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 15 (некоторые из которых (HCVR) идентичны SEQ ID NO: 15) и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 16, (некоторые из которых (LCVR) идентичны SEQ ID NO: 16).

Рекомбинантные антигенсвязывающие белки, которые являются антителами, могут использоваться в качестве детекторных молекул (DM).

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный антигенсвязывающий белок представляет собой слитый с ScFv белок, который в некоторых случаях включает вариабельный домен тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична (или идентична) SEQ ID NO: 15, вариабельный домен легкой цепи с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична (или идентична) SEQ ID NO: 16, и мембранный якорный домен. В одном варианте осуществления мембранный якорный домен происходит от Fc-рецептора, например, трансмембранный домен белка Fc RI человека, представленный в SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 21, который содержит не только трансмембранный домен, но и С-концевой цитоплазматический домен (SEQ ID NO: 18). В одном конкретном варианте осуществления слитый с ScFv белок имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. Рекомбинантные антигенсвязывающие белки, которые представляют собой слитые с ScFv белки, могут использоваться в качестве CSCP и DM.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается полинуклеотид, который кодирует антигенсвязывающий белок предыдущего аспекта. В одном варианте осуществления, например, в случае, когда антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, полинуклеотид кодирует легкую цепь. Также полинуклеотид может кодировать тяжелую цепь. В случае, когда антигенсвязывающий белок представляет собой слитый с ScFv белок, полинуклеотид может кодировать слитый белок ScFv-FcγR-TM-cyto с SEQ ID NO: 19. Например, полинуклеотид SEQ ID NO: 20 кодирует SEQ ID NO: 19.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается вектор в виде нуклеиновой кислоты, который включает полинуклеотид предыдущего аспекта. В одном варианте осуществления вектор включает полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий белок, который функционально связан с

находящимся 5′ промотором и за которым следует находящаяся 3′ последовательность полиаденилирования. Промотором может быть любой промотор, такой как, например, промотор CMV. Таким образом, в одном случае вектор может содержать последовательность SEQ ID NO: 25. В одном варианте осуществления вектор может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует селектируемый маркер, такой как, например, устойчивость к неомицину. В одном варианте осуществления вектор может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует используемый для переноса энергии белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP) или его производное, например, желтый флуоресцентный белок (YFP). Таким образом, в одном случае вектор может содержать последовательность SEQ ID NO: 24.

Вектор может быть замкнутым в круг или линейным, эписомным по отношению к геному клетки-хозяина или интегрированным в геном клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой замкнутую в круг плазмиду, которая в одном конкретном варианте осуществления имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23 для кодирующего ScFv-FcγR-TM-cyto полинуклеотида, в другом конкретном варианте осуществления включает нуклеотидную последовательность кодирующего тяжелую цепь антитела полинуклеотида, и в еще одном конкретном варианте осуществления включает нуклеотидную последовательность кодирующего легкую цепь антитела полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой линейную конструкцию, которая может быть интегрирована в хромосому клетки-хозяина. В одном конкретном варианте осуществления линейная конструкция имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 22 для кодирующего ScFv-FcγR-TM-cyto полинуклеотида. В другом конкретном варианте осуществления линейная конструкция включает нуклеотидную последовательность кодирующего тяжелую цепь антитела полинуклеотида. В еще одном конкретном варианте осуществления линейная конструкция включает нуклеотидную последовательность кодирующего легкую цепь

антитела полинуклеотида.

Клеткой-хозяином может быть любая клетка, прокариотическая или эукариотическая. Однако в одном конкретном варианте осуществления клеткой-хозяином является клетка CHO, такая как клетка CHO-K1.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается клетка-хозяин, которая экспрессирует антигенсвязывающий белок предыдущего аспекта и/или содержит полинуклеотид или вектор в виде нуклеиновой кислоты предыдущих аспектов. В некоторых вариантах осуществления клеткой-хозяином является клетка CHO. В конкретном варианте осуществления клеткой-хозяином является клетка CHO-K1. В одном варианте осуществления клетка-хозяин используется для продукции представляющего интерес белка, и антигенсвязывающий белок используется в качестве захватывающего белка клеточной поверхности в соответствии со способами, описанными в этой заявке.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается клетка-хозяин, применимая для продукции представляющего интерес белка. Клетка-хозяин содержит полинуклеотид или вектор в виде нуклеиновой кислоты предыдущего аспекта и продуцирует антигенсвязывающий белок предыдущего аспекта, который служит в качестве захватывающего белка клеточной поверхности. Захватывающий белок клеточной поверхности связывается с представляющим интерес белком внутри клетки-хозяина и переносится с помощью секреторного аппарата клетки, и экспрессируется на поверхности клетки-хозяина. Таким образом, в одном варианте осуществления клетка-хозяин включает захватывающий белок клеточной поверхности, расположенный в плазматической мембране клетки-хозяина, при этом захватывающая составляющая обращена наружу от клетки. В одном варианте осуществления захватывающая молекула клеточной поверхности, которая расположена в плазматической мембране и ориентирована наружу от клетки, связана с представляющим интерес белком.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин продуцирует или способна продуцировать слитый с ScFv белок, который связывается с представляющим интерес белком, который содержит

Fc-домен, который содержит гистидин в положении 95 в соответствии с IMGT и тирозина в положении 96 в соответствии с IMGT. Примеры включают белки IgG1, IgG2 и IgG4. В одном варианте осуществления слитый с ScFv белок содержит аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31. В одном конкретном варианте осуществления слитый с ScFv белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин включает захватывающий белок клеточной поверхности, расположенный в плазматической мембране и связанный с IgG1, IgG2 или IgG4 или биспецифическим антителом, которое содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь IgG1, IgG2 или IgG4 и которое может иметь вторую тяжелую цепь, которая является таковой другого типа или содержит одну или несколько аминокислотных замен.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается рекомбинантный антигенсвязывающий белок, который связывается с замещенным CH3-полипептидом, содержащим одну или более аминокислотных замен, выбираемых из группы, состоящей из (a) 95R и (b) 95R и 96F в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT, или (a') 435R, и (b') 435R и 436F в соответствии с EU системой нумерации, или любым белком, который включает, например, аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, которая кодирует замещенный Fc человека (также известный как Fc*). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный антигенсвязывающий белок связывается с полипептидом с K_D, составляющей менее приблизительно 60 нМ, как определено в анализе с использованием поверхностного плазмонного резонанса.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный антигенсвязывающий белок включает один или более определяющих комплементарность участков (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 38, или вариабельной области легкой цепи (LCVR), имеющей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 39. В одном случае белок включает CDR-1 тяжелой цепи

(HCDR-1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, HCDR-2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, HCDR-3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, CDR-1 легкой цепи (LCDR-1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и LCDR-2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36. В некоторых случаях белок включает HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 38 (некоторые из которых идентичны SEQ ID NO: 39), и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 39 (некоторые из которых идентичны SEQ ID NO: 39).

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, которое включает тяжелую цепь и легкую цепь. Тяжелая цепь может включать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична (или идентична на 100%) SEQ ID NO: 40. Легкая цепь может включать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична (или идентична на 100%) SEQ ID NO: 41. Рекомбинантные антигенсвязывающие белки, которые являются антителами, могут использоваться в качестве детекторных молекул (DM).

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный антигенсвязывающий белок представляет собой слитый с ScFv белок, который в некоторых случаях включает вариабельный домен тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична (или идентична) SEQ ID NO: 38, вариабельный домен легкой цепи с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична (или идентична) SEQ ID NO: 39, и мембранный якорный домен. В одном варианте осуществления мембранный якорный домен происходит от Fc-рецептора, например, трансмембранный домен белка FcγRI человека, представленный в SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 21, который содержит не только трансмембранный домен, но и С-концевой цитоплазматический домен SEQ ID NO: 19. В одном

конкретном варианте осуществления слитый с ScFv белок имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43. Рекомбинантные антигенсвязывающие белки, которые представляют собой слитые с ScFv белки, могут использоваться в качестве CSCP и DM.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается полинуклеотид, который кодирует антигенсвязывающий белок предыдущего аспекта. В одном варианте осуществления, например, в случае, когда антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, полинуклеотид кодирует легкую цепь, такую как, например, легкая цепь SEQ ID NO: 41. Также полинуклеотид может кодировать тяжелую цепь, такую как, например, тяжелая цепь SEQ ID NO: 40. В случае, когда антигенсвязывающий белок представляет собой слитый с ScFv белок, полинуклеотид может кодировать слитый белок ScFv-FcγR-TM-cyto с SEQ ID NO: 43. Типичные, приводимые в качестве примера полинуклеотиды включают полинуклеотиды SEQ ID NO: 49, 50 и 51, соответственно.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается вектор в виде нуклеиновой кислоты, который включает полинуклеотид предыдущего аспекта. В одном варианте осуществления вектор включает полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий белок, который функционально связан с находящимся 5′ промотором и за котором следует находящаяся 3′ последовательность полиаденилирования. Промотором может быть любой промотор, такой как, например, промотор CMV. Таким образом, в одном случае вектор может содержать последовательность SEQ ID NO: 47. В одном варианте осуществления вектор может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует селектируемый маркер, такой как, например, устойчивость к неомицину. В одном варианте осуществления вектор может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует используемый для переноса энергии белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP) или его производное, например, желтый флуоресцентный белок (YFP). Таким образом, в одном случае вектор может содержать последовательность SEQ ID NO: 46.

Вектор может быть замкнутым в круг или линейным, эписомным по отношению к геному клетки-хозяина или интегрированным в геном клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой замкнутую в круг плазмиду, которая в одном конкретном варианте осуществления имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 44 для кодирующего ScFv-FcγR-TM-cyto полинуклеотида, в другом конкретном варианте осуществления имеет нуклеотидную последовательность кодирующего тяжелую цепь антитела полинуклеотида, и в еще одном конкретном варианте осуществления имеет нуклеотидную последовательность кодирующего легкую цепь антитела полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой линейную конструкцию, которая может быть интегрирована в хромосому клетки-хозяина. В одном конкретном варианте осуществления линейная конструкция включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 51 для кодирующего ScFv-FcγR-TM-cyto полинуклеотида. В другом конкретном варианте осуществления линейная конструкция включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 50 для кодирующего тяжелую цепь антитела полинуклеотида. В еще одном конкретном варианте осуществления линейная конструкция включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 49 для кодирующего легкую цепи антитела полинуклеотида.

Клеткой-хозяином может быть любая клетка, прокариотическая или эукариотическая. Однако в одном конкретном варианте осуществления клеткой-хозяином является клетка CHO, такая как клетка CHO-K1.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается клетка-хозяин, которая экспрессирует антигенсвязывающий белок предыдущего аспекта, и/или содержит полинуклеотид или вектор в виде нуклеиновой кислоты предыдущих аспектов. В некоторых вариантах осуществления клеткой-хозяином является клетка CHO. В конкретном варианте осуществления клеткой-хозяином является клетка CHO-K1. В одном варианте осуществления клетка-хозяин используется для продукции представляющего интерес белка, и антигенсвязывающий белок используется в качестве захватывающего

белка клеточной поверхности в соответствии со способами, описанными в этой заявке.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается клетка-хозяин, применимая для продукции представляющего интерес белка. Клетка-хозяин содержит полинуклеотид или вектор в виде нуклеиновой кислоты предыдущего аспекта и продуцирует антигенсвязывающий белок предыдущего аспекта, который служит в качестве захватывающего белка клеточной поверхности. Захватывающий белок клеточной поверхности связывается с представляющим интерес белком внутри клетки-хозяина и переносится с помощью секреторного аппарата клетки, и экспрессируется на поверхности клетки-хозяина. Таким образом, в одном варианте осуществления клетка-хозяин включает захватывающий белок клеточной поверхности, расположенный в плазматической мембране клетки-хозяина, при этом захватывающая составляющая обращена наружу от клетки. В одном варианте осуществления захватывающая молекула клеточной поверхности, которая расположена в плазматической мембране и ориентирована наружу от клетки, связана с представляющим интерес белком.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин продуцирует или способна продуцировать слитый с ScFv белок, который связывается с представляющим интерес белком, который содержит Fc-домен, который содержит аргинин в положении 95 в соответствии с IMGT и фенилаланин в положении 96 в соответствии с IMGT (Fc*). Примеры включают IgG3 и замещенные CH3-области белков IgG1, IgG2 и IgG4. В одном варианте осуществления слитый с ScFv белок содержит аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37. В одном конкретном варианте осуществления слитый с ScFv белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43. В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин включает захватывающий белок клеточной поверхности, расположенный в плазматической мембране и связанный с IgG3 или замещенным IgG1, IgG2 или IgG4, который содержит аргинин в положении 95 в соответствии с IMGT и фенилаланин в положении 96 в соответствии с IMGT («Fc*»), или

биспецифическим антителом, содержащим по меньшей мере одну тяжелую цепь Fc*-типа и другую тяжелую цепи IgG1, IgG2 или IgG4 дикого типа.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ детектирования, выделения или обогащения в отношении клетки, которая стабильно экспрессирует представляющий интерес белок (POI). Способ включает стадию экспрессии в клетке-хозяине захватывающего белка клеточной поверхности (CSCP) и POI. В соответствии с этим способом CSCP связывается с «первым сайтом» в POI с образованием комплекса CSCP-POI внутри клетки-хозяина. Этот комплекс CSCP-POI затем переносится с помощью секреторной системы клетки-хозяина и секретируется из клетки. Поскольку CSCP содержит связывающийся с мембраной домен (например, SEQ ID NO: 17), комплекс CSCP-POI представляется на поверхности клетки-хозяина, с обращением POI наружу от клетки. В соответствии со способом клетку-хозяина затем приводят в контакт с детекторной молекулой (DM), которая связывается со «вторым сайтом» в POI. Те клетки, которые связываются с DM, отбирают для идентификации, выделения, объединения и/или обогащения. В одном варианте осуществления связанную с DM клетку отбирают с помощью сортировки клеток с возбуждением флуоресценции.

В одном варианте осуществления способ также включает стадию приведения клетки в контакт с блокирующей молекулой до отбора клетки-хозяина. Блокирующая молекула связывается с любым CSCP, который не связан с POI. Блокирующая молекула не связывается с комплексом CSCP-POI.

В некоторых вариантах осуществления POI содержит множество субъединиц, например, антитело, которое содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи. В этом случае первый сайт в POI может находиться в первой субъединице, а второй сайт в POI может находиться во второй субъединице. В некоторых вариантах осуществления POI содержит множество субъединиц, например, гетеродимерный белок. В случае гетеродимерного белка, первый сайт в POI может находиться в первой субъединице, например, первом рецепторе, а второй сайт в POI может находиться во

второй субъединице, например, втором рецепторе или корецепторе. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерные белки представляют собой разные рецепторы, которые взаимодействуют с образованием гетеродимера. Если POI представляет собой антитело, первый сайт в POI может находиться в первой тяжелой цепи, а второй сайт в POI может находиться во второй тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит субъединицы, которые отличаются по меньшей мере одной аминокислотой, например, антитело, содержащее по меньшей мере одну тяжелую цепь с CH3-доменом дикого типа и другую тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену в CH3-домене. В этом случае CSCP может представлять собой антигенсвязывающий белок, описываемый здесь, например, антиген или слитый с ScFv против Ig белок. Здесь детекторная молекула (DM) может включать меченый рекомбинантный антигенсвязывающий белок, описываемый здесь, например, меченую молекулу антигена или антитела или ScFv против Ig.

В некоторых случаях, например, когда POI является биспецифическое антитело, первый сайт может находиться в тяжелой цепи, которая имеет CH3-домен, содержащий остаток гистидина в положении 95 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT и остаток тирозина в положение 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT (Fc). В таком случае второй сайт может находиться в тяжелой цепи, которая имеет CH3-домен, содержащий остаток аргинина в положении 95 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT и остаток фенилаланина в положении 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT (Fc*). В этом случае CSCP может представлять собой антигенсвязывающий белок, описанный в предыдущем аспекте, такой как слитый с ScFv белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31; который в конкретном варианте осуществления включает SEQ ID NO: 19. Здесь также детекторная молекула (DM) может включать меченый рекомбинантный антигенсвязывающий белок, описанный в предыдущем аспекте, например, молекулу антитела или ScFv, содержащую аминокислотные

последовательности SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37; который в конкретном варианте осуществления включает или SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 41 (антитело против Fc*), или SEQ ID NO: 43 (ScFv*). Здесь блокирующей молекулой может быть полипептид Fc (например, одноцепочечный), такой как hFc, или любая молекула, которая может связываться с CSCP без связывания также с DM. В одном варианте осуществления детекторной молекулой может быть меченый $F(ab')_2$ антитела против IgG человека.

В других случаях, в которых POI является биспецифическое антитело, первый сайт может находиться в тяжелой цепи, которая имеет CH3-домен, содержащий остаток аргинина в положении 95 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT и остаток фенилаланина в положении 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT (Fc*). В таком случае второй сайт может находиться в тяжелой цепи, которая имеет CH3-домен, содержащий остаток гистидина в положении 95 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT и остаток тирозина в положении 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT. В этом случае CSCP может представлять собой антигенсвязывающий белок, описанный в предыдущем аспекте, такой как слитый с ScFv белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37; который в конкретном варианте осуществления включает SEQ ID NO: 43. Здесь также детекторная молекула (DM) может включать меченый рекомбинантный антигенсвязывающий белок, описанный в предыдущем аспекте, например, молекулу антитела или ScFv, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31; который в конкретном варианте осуществления включает или тяжелую цепь и легкую цепь (антитело против hFc), или SEQ ID NO: 19 (ScFv). Здесь блокирующей молекулой может быть полипептид Fc* (например, одноцепочечный), или любая молекула, которая может связываться с CSCP без связывания также с DM. В одном варианте осуществления детекторной молекулой может быть меченый $F(ab')_2$ антитела против IgG человека.

В некоторых аспектах настоящим изобретением обеспечивается способ детектирования или выделения клетки, которая стабильно экспрессирует гетеродимерный белок, включающий стадии (a) экспрессии в клетке-хозяине захватывающего белка клеточной поверхности (CSCP) и гетеродимерного белка, причем (i) CSCP связывается с первым сайтом в гетеродимерном белке с образованием комплекса CSCP-гетеродимерный белок внутри клетки-хозяина, (ii) комплекс CSCP-гетеродимерный белок переносится через клетку-хозяина и (iii) затем представляется на поверхности клетки-хозяина; (b) приведения клетки-хозяина в контакт с детекторной молекулой, причем детекторная молекула связывается со вторым сайтом в гетеродимерном белке; и (c) отбора клетки-хозяина, которая связывается с детекторной молекулой. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный белок включает множество субъединиц, и первый сайт в гетеродимерном белке находится в первой субъединице, а второй сайт в гетеродимерном белке находится во второй субъединице. В некоторых вариантах осуществления захватывающая молекула клеточной поверхности включает антиген, белок A или ScFv, способный связываться с первой субъединицей, а не со второй субъединицей.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ получения биспецифического антитела, включающий стадию экспрессии в клетке-хозяине захватывающего белка клеточной поверхности («CSCP»), легкой цепи антитела, первой тяжелой цепи антитела, которая содержит CH3-домен, содержащий гистидин в положении 95 в соответствии с IMGT и тирозин в положении 96 в соответствии с IMGT, и второй тяжелой цепи антитела, которая содержит CH3-домен, содержащий аргинин в положении 95 в соответствии с IMGT и фенилаланин в положении 96 в соответствии с IMGT. Находясь внутри клетки-хозяина, CSCP связывается с первой тяжелой цепью антитела, но не связывается со второй тяжелой цепью антитела, вторая тяжелая цепь антитела связывается с первой тяжелой цепью антитела, и легкие цепи связываются с тяжелыми цепями, образуя таким образом тройной комплекс CSCP-антитело. Этот тройной комплекс секретируется и

представляется на поверхности клетки-хозяина. Клетку-хозяина можно привести в контакт с блокирующей молекулой, которая связывается с CSCP на клеточной поверхности, но только в тех случаях, когда CSCP не связан с представляющим интерес антителом, т.е. «пустым» CSCP. Затем клетку-хозяина приводят в контакт с DM, которая связывается или способна связываться со второй тяжелой цепью антитела. Клетку-хозяина, которая связывается с DM, идентифицируют, отбирают и/или объединяют. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяев, которые связываются с DM, отбирают, объединяют, подвергают культивированию и размножают, а затем подвергают еще одному циклу экспрессии, детектирования, отбора, объединения и размножения. Этот процесс может быть повторен несколько раз для обогащения с целью получения высоких титров биспецифических антител.

В одном варианте осуществления CSCP, используемым в способе, является слитый с ScFv белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31. В одном варианте осуществления CSCP включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В одном варианте осуществления DM, используемым в способе, является белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37. В одном варианте осуществления DM является антитело, включающее последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 40 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 41. В другом варианте осуществления DM является слитый с ScFv белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43. Метка, например, флуоресцентная составляющая вроде FITC или Alexa Fluor® 488, может быть присоединена к DM. Сортировка клеток с возбуждением флуоресценции может использоваться в качестве способа детектирования и отбора.

В альтернативном варианте осуществления способ получения биспецифическего антитела включает стадию экспрессии в клетке-хозяине захватывающего белка клеточной поверхности («CSCP»),

легкой цепи антитела, первой тяжелой цепи антитела, которая содержит CH3-домен, содержащий аргинин в положении 95 в соответствии с IMGT и фенилаланин в положении 96 в соответствии с IMGT (Fc*), и второй тяжелой цепи антитела, которая содержит CH3-домен, содержащий гистидин в положении 95 в соответствии с IMGT и тирозин в положении 96 в соответствии с IMGT. Находясь внутри клетки-хозяина, CSCP связывается с первой тяжелой цепью антитела, но не связывается со второй тяжелой цепью антитела, вторая тяжелая цепь антитела связывается с первой тяжелой цепью антитела, и легкие цепи связываются с тяжелыми цепями, образуя таким образом тройной комплекс CSCP-антитело. Этот тройной комплекс секретируется и представляется на поверхности клетки-хозяина. Клетку-хозяина можно привести в контакт с блокирующей молекулой, которая связывается с CSCP на клеточной поверхности, но только в тех случаях, когда CSCP не связан с представляющим интерес антителом, т.е. «пустым» CSCP. Затем клетку-хозяина приводят в контакт с DM, которая связывается или способна связываться со второй тяжелой цепью антитела. Клетку-хозяина, которая связывается с DM, идентифицируют, отбирают и/или объединяют. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяев, которые связываются с DM, отбирают, объединяют, подвергают культивированию и размножают, а затем подвергают еще одному циклу экспрессии, детектирования, отбора, объединения и размножения. Этот процесс может быть повторен несколько раз для обогащения с целью получения высоких титров биспецифических антител.

В одном варианте осуществления этого альтернативного варианта осуществления CSCP, используемым в способе, является слитый с ScFv белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37. В одном варианте осуществления CSCP включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43. В одном варианте осуществления DM, используемым в способе, является белок, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31. В одном варианте осуществления

DM является антитело, включающее последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи. В другом варианте осуществления DM является слитый с ScFv белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. Метка, например, флуоресцентная составляющая вроде FITC или Alexa Fluor® 488, может быть присоединена к DM. Сортировка клеток с возбуждением флуоресценции может использоваться в качестве способа детектирования и отбора.

Как в первом варианте осуществления, так и в альтернативном варианте осуществления клетка-хозяин, которая является продуктом итеративного отбора, объединения и размножения, способна продуцировать, или действительно продуцирует, биспецифическое антитело с титром, составляющим по меньшей мере 2 г/л, причем тип биспецифического антитела (Fc/Fc*) составляет по меньшей мере 40% по массе от общего количества антитела, продуцируемого клеткой-хозяином (Fc/Fc+Fc*/Fc*+Fc/Fc*).

Другие цели и преимущества станут очевидными в результате рассмотрения последующего подробного описания.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Прежде чем способы настоящего изобретения будут описаны, следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретными способами и экспериментальными условиями, которые описаны, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Также следует понимать, что используемая здесь терминология предназначена лишь для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Используемые в этом описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «способ» включает один или более способов и/или стадий типа, который описан здесь и/или который станет очевидным квалифицированным в данной области техники специалистам после прочтения этого описания, и так

далее.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют значение, одинаковое со значением, в котором они обычно понимаются специалистом со средним уровнем компетентности в области техники, к которой относится это изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые здесь описаны, могут использоваться при осуществлении на практике или проверке настоящего изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны ниже. Все публикации, упомянутые здесь, включены сюда посредством ссылки в их полном объеме.

Общее описание

Способ настоящего изобретения обеспечивает значительные преимущества по сравнению с существующими способами выделения и идентификации секретирующих белки клеток. Например, клетки, которые секретируют антитела, можно быстро и удобно выделить на основе желаемой специфичности, авидности или изотипа. Кроме того, количество секретируемого белка, который продуцируется, можно определить непосредственно, в отличие от многих способов в предшествующем уровне техники, в которых количество продукции секретируемого белка определяют косвенно.

В последнее время два дополнительных способа, в которых используется проточная цитометрия, были разработаны для выделения с высокой пропускной способностью стабильных линий клеток с высоким уровнем экспрессии. Первый способ включает модификацию экспрессионной плазмиды с включением транскрипционного считывания мРНК с GOI. Это чаще всего осуществляется путем вставки участка внутренней посадки рибосом (IRES) и гена, белковый продукт которого легко контролировать с помощью проточной цитометрии, чаще всего зеленый флуоресцентный белок (GFP), между стоп-кодоном в GOI и концевым сайтом полиА (Meng et al. (2000) Gene 242: 201). Присутствие IRES позволяет POI и GFP транслироваться с одной и той же мРНК. Таким образом, уровень экспрессии гена GFP косвенно связан с уровнем мРНК с GOI. Клоны, которые накапливают в GFP на высоких уровнях, выделяют с помощью проточной цитометрии, а затем подвергают

скринингу на предмет продукции POI. Поскольку этот способ зависит от сочетания экспрессии GOI с геном-репортером путем использования IRES в рекомбинантной конструкции, он не применим к выделению гибридом.

Использование проточной цитометрии при выделении экспрессирующих клонов создает возможность для быстрого анализа большого числа клонов в формате высокой пропускной способности. Кроме того, использование проточной цитометрии значительно снижает прямое манипулирование клетками. К сожалению, уровень продукции GFP не является прямым показателем уровня продукции POI. Различные механизмы могут разъединять продукцию секретируемого POI от накопления GFP. Различия в продукции POI и репортера GFP могут возникнуть в результате различий в эффективности трансляции двух генов, эффективности секреции POI или стабильности полицистронной мРНК.

Другой способ, в котором используется проточная цитометрия для выделения экспрессирующих клонов, включает инкапсуляцию клеток в агарозное микродраже (Weaver et al. (1990) Methods Enzymol. 2: 234). В этом способе биотинилированные антитела, специфические для POI, связывают с биотинилированной агарозой с помощью стрептавидина, так что секретируемый POI захватывается и удерживается в микродраже (Gray et al., (1995) J. Immunol. Methods 182: 155). Захваченный POI детектируют с помощью иммуноокрашивания с использованием антитела, специфического для POI. Чтобы уменьшить поглощение POI, секретируемого из соседних клеток, инкапсулирующей агарозой, клетки помещают в среду с низким уровнем проницаемости. Эти клетки с наибольшим окрашиванием антителом POI в инкапсулирующей агарозе идентифицируют и выделяют с помощью проточной цитометрии. В способе с использованием гелевого микродраже клетки скринируются непосредственно в отношении их способности секретировать POI, а не косвенно в отношении экспрессии мРНК с GOI, но для этой процедуры необходимо наличие подходящих антител для захвата и окрашивания секретируемого POI, и для нее необходимо специальное оборудование для образования агарозного гелевого микродраже. Кроме того, некоторые клетки могут быть

чувствительными к процессу инкапсуляции.

Один из вариантов этого способа позволяет обойти требование встраивать клетки в матрицу за счет непосредственного связывания антитела, специфического для POI, с клеточной поверхностью (Manz et al. (1995) PNAS 92: 1921-1925). В этом способе за неспецифическим биотинилированием белков клеточной поверхности с использованием биотин-гидроксисукцинимидного эфира следует контактирование с конъюгированным со стрептовидином антителом, способным связываться с POI. Клетки, секретирующие POI, становятся «декорированными» POI, который затем детектируют с помощью соответствующего меченого второго антитела. Однако диффузия POI между соседними клетками является проблематичной, и для этого способа также необходима среда с высокой вязкостью, чтобы уменьшить диффузию POI от экспрессирующих клеток. Поскольку эти среды с высокой вязкостью необходимы для различения клетки, клетки должны быть промыты и помещены в среду, подходящую для сортировки клеток, если это желательно.

Проблемы, связанные с идентификацией и выделением линий рекомбинантных клеток с высоким уровнем экспрессии, особенно распространяются на выделение гибридом, которые экспрессируют представляющее интерес антитело. Однако идентификация полезных гибридом включает несколько дополнительных проблем; их необходимо сначала скринировать в отношении антигенсвязывающей активности, затем в отношении изотипа иммуноглобулина. Кроме того, способы на основе GFP не применимы к идентификации и выделению гибридом, поскольку создание гибридом не включает рекомбинантный компонент, чтобы экспрессию генов антител можно было связать с транскрипцией репортера, такого как GFP. Скрининг гибридом является медленным, трудоемким предприятием, в котором скринируемое количество клонов ограничено существующими технологиями.

Настоящее изобретение описывает новый и ранее неизвестный способ идентификации и выделения клеток, которые продуцируют секретируемые белки. Настоящее изобретение основано на получении линии клеток, которая экспрессирует молекулу,

располагаемую на поверхности клетки, которая связывается с POI. Представленный на клеточной поверхности POI можно затем детектировать посредством мечения различными детекторными молекулами. Количество POI, представленного на поверхности клеток, в определенных условиях, является прямым показателем общего количества секретированного POI. Продуценты POI могут быть затем отделены от непродуцентов, и уровни продукции или характеристики POI могут быть дифференцированы. Преимущество настоящего изобретения заключается в том, что в нем непосредственно определяется количество секретируемого POI, а не косвенно измеряется мРНК.

Это изобретение относится к созданию и использованию клеток, которые экспрессируют захватывающие молекулы клеточной поверхности, которые связываются с различными секретируемыми POI в той же клетке, которая продуцирует POI. По мере секреции клеткой POI эти захватывающие молекулы клеточной поверхности связывают его, или комплексы POI и захватывающих молекул клеточной поверхности могут образовываться внутриклеточно, а затем секретироваться. Связывание может происходить аутокринным образом или при секреции. Клетки, которые продуцируют секретируемый POI, можно затем идентифицировать и выделить. Такая идентификация и выделение могут быть основаны на характеристиках POI, продукции POI или отсутствии таковых, или согласно конкретным уровням продукции. Захватывающую молекулу клеточной поверхности и/или POI может продуцировать клетка в ее природном состоянии, или захватывающие молекулы клеточной поверхности и/или POI могут быть продуцированы рекомбинантно. Посредством создания или использования такой клетки, любой секретируемый белок может быть захвачен захватывающей молекулой клеточной поверхности при наличии соответствующего сродства между ними. Как объясняется далее, можно осуществлять манипулирование любой молекулой таким образом, чтобы ее можно было использовать в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности. Следовательно, это изобретение может использоваться для выделения любой клетки, которая секретирует белок.

Почти любой белок обладает способностью функционировать в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности, как описано в настоящем изобретении. Что необходимо, это способность желаемого белка к прикреплению к клеточной мембране и выставлению во внеклеточное пространство. Если желаемая клетка имеет сигнальную последовательность, то только мембранный якорь, в том числе, но без ограничения, трансмембранный якорь или сигнал сцепления GPI, нужно добавить к захватывающей молекуле клеточной поверхности, чтобы он оставался прикрепленным к клеточной мембране с обращением наружу от клетки. Кроме того, если в желаемом белке отсутствует сигнальная последовательность, сигнальная последовательность может быть добавлена к амино-концу желаемого белка, чтобы он переносился к поверхности клетки. Сигнальная последовательность и мембранный якорь могут быть природными по отношению к клетке, рекомбинантными или синтетическими.

Клетки часто секретируют широкий ряд белков, эндогенно или после введения рекомбинантной ДНК. Любой секретируемый белок можно идентифицировать, и клетку, продуцирующую его, можно выделить в соответствии со способом этого изобретения. Такие секретируемые белки включают, но без ограничения, факторы роста, рецепторы факторов роста, лиганды, растворимые компоненты рецепторов, антитела, биспецифические антитела, рекомбинантные молекулы Trap (-ловушки), Fc-содержащие слитые белки, sTCR, TCR-Fc и пептидные гормоны. Такие секретируемые белки могут быть или могут не быть рекомбинантными. Т.е. для секреции некоторых представляющих интерес белков из желаемой клетки может не требоваться введение дополнительных нуклеотидных последовательностей. Например, секреция антител из В-клеток или плазматических клеток не является результатом введения рекомбинантных нуклеотидных последовательностей в В-клетку или плазматическую клетку. Рекомбинантные секретируемые белки могут быть получены с помощью стандартных методов молекулярной биологии, хорошо известных квалифицированному специалисту (см., например, Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second

Edition, Vols 1, 2, and 3, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel et al., Greene Publ. Assoc., Wiley Interscience, NY). Эти секретируемые белки полезны для многих коммерческих и научных целей. Это изобретение охватывает продукцию таких секретируемых белков благодаря методологии настоящего изобретения. Детектирование клеток с представленным на поверхности POI может быть достигнуто за счет использования любой молекулы, способной прямо или косвенно связываться с представленным на поверхности POI. Такие детекторные молекулы могут способствовать детектированию и/или выделению клеток, представляющих POI на поверхности.

Настоящее изобретение применимо к выделению, в частности, a) лиганд-продуцирующих клеток, используя лиганд-специфический рецептор в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности, b) продуцирующих растворимые рецепторы клеток, используя специфический для связанного с поверхностью рецептора лиганд в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности, c) продуцирующих антитела клеток, используя связывающийся с антителом белок в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности, d) sTCR, используя s-TCR-связывающий белок (например, антиген, распознаваемый TCR) в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности, e) TCR-Fc, используя Fc-связывающий белок в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности, или f) биспецифических антител, которые содержат мутацию в одном из своих CH3-доменов, которая аннулирует связывание с белком A, используя захватывающую молекулу в виде слитого белка, который включает ScFv-домен, слитый с трансмембранным и цитоплазматическим доменом FcγR.

В соответствии с методологией этого изобретения клетку сначала трансфицируют вектором, содержащим нуклеотидную последовательность, которая кодирует захватывающую молекулу клеточной поверхности, которая способна связывать секретируемый POI, в условиях, когда такая захватывающая молекула клеточной поверхности экспрессируется. Трансфицированные клетки, которые являются подходящими продуцентами таких захватывающих молекул

клеточной поверхности, затем детектируют и выделяют, и такие клетки подвергают культивированию. Эти клетки или могут по своей природе продуцировать POI, или POI может продуцироваться рекомбинантно. Если клетки по своей природе продуцируют POI, они готовы к детектированию и выделению. Если POI необходимо продуцировать рекомбинантно, то выделенные и подвергнутые культивированию клетки, экспрессирующие определенную захватывающую молекулу клеточной поверхности, трансфицируют второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей секретируемый POI, в условиях, когда секретируемый POI экспрессируется. При экспрессии, секретируемый POI связывается с захватывающими молекулами клеточной поверхности, и клетки, представляющие связанный POI на поверхности, детектируют и выделяют.

Если клетка продуцирует POI природно, клетку не будут трансфицировать нуклеотидной последовательностью, кодирующей POI. Следовательно, этот аспект настоящего изобретения применим к любым и всяким клеткам, продуцирующим POI. Кроме того, если клетка продуцирует природно захватывающую молекулу клеточной поверхности, клетку не нужно трансфицировать нуклеотидными последовательностями, кодирующими захватывающую молекулу клеточной поверхности. Следовательно, этот аспект настоящего изобретения применим к любым и всяким клеткам, продуцирующим захватывающую молекулу клеточной поверхности.

Широкий ряд клеток-хозяев может быть трансфицирован. Эти клетки могут иметь или эукариотическое, или прокариотическое происхождение. Часто клетки будут иммортализованными эукариотическими клетками и, в частности, клетками млекопитающих, например, клетками почки обезьян (COS), клетками яичника китайского хомячка (CHO), клетками HeLa, клетками почки детеныша хомячка (BHK), клетками почки эмбриона человека (HEK293), лейкоцитами, миеломами, линиями клеток, трансфицированных генами аденовируса, например, AD5 E1, включая, но без ограничения, иммортализованные клетки сетчатки человека, трансфицированные геном аденовируса, например, клетки PER.C6™, и эмбриональными стволовыми клетками. Эти клетки могут

быть также клетками не млекопитающих, включая бактериальные клетки, клетки грибов, дрожжей и насекомых, в том числе, но без ограничения, например, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilus*, виды Aspergillus, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*. Все клетки могут быть выращены в среде для планшетов для культивирования в соответствующих условиях или в синергическом хозяине. Наиболее желательными клетками будут клетки млекопитающих, которые можно культивировать.

Секретируемый POI, связанный с захватывающей молекулой клеточной поверхности, можно детектировать и выделить с помощью различных методов, известных в данной области техники. Клетки в культурах, представляющие секретируемый POI на своей поверхности, можно привести в контакт с (а) молекулой(ами), способной прямо или косвенно связываться с секретируемым POI, причем такая детекторная молекула(ы) может содержать метку детектирования, такую как, например, хромогенная, флуорогенная, имеющая окраску, флуоресцентная или магнитная метка. Метку, связанную с детекторной молекулой, можно детектировать, и клетки выделить, используя различные методы. Наиболее предпочтительно, когда в популяции клеток будут детектировать метку, а клетку выделять, используя проточную цитометрию. Альтернативно, детекторную молекулу можно использовать для непосредственно выделения клеток, представляющих POI на своей поверхности. Это может быть достигнуто путем конъюгации детекторной молекулы с планшетом для культивирования, парамагнитными молекулами или любой другой частицей или твердой подложкой. Кроме того, представленный на поверхности POI можно детектировать непосредственно по свойствам детекторной молекулы или POI.

В одном варианте осуществления две детекторные молекулы, которые связываются друг с другом и по-разному помечены, используются для детектирования представленного на поверхности, секретированного POI, который блокирует это взаимодействие. Если клетка представляет на своей поверхности секретируемый POI, который связывается с первой детекторной молекулой и блокирует взаимодействие между первой и второй детекторной

молекулой, то клетку можно выделить на основе присутствия только первой детекторной молекулы на ее поверхности. С другой стороны, если клетка представляет на своей поверхности секретируемый POI, который связывается с первой детекторной молекулой, но не блокирует взаимодействие между первой и второй детекторной молекулой, то клетку можно выделить на основе присутствия обеих детекторных молекул на ее поверхности. Например, продуцирующие антитела клетки, экспрессирующие антитела, которые специфически блокируют, или не блокируют, образование комплекса рецептор-лиганд, могут быть идентифицированы. Если детекторными молекулами являются рецептор и его лиганд, которые по-разному помечены, то продуцирующую антитело клетку, которая экспрессирует антитела, которые блокируют образование комплекса рецептор-лиганд, можно детектировать по присутствию одной метки на ее поверхности, тогда как продуцирующую антитела клетку, которая экспрессирует антитела, которые не блокируют образование комплекса рецептор-лиганд, можно детектировать по присутствию обеих меток на ее поверхности.

В любом из вариантов осуществления, и в отношении отделения экспрессирующих клеток от не экспрессирующих клеток или в меньшей степени экспрессирующих клеток, одним из основных препятствий, когда POI является секретируемый белок, является диффузия POI между соседними клетками. Следовательно, очень важно, что любая система, которая предназначена для захвата секретированного POI на клеточную поверхность, должна предотвратить диффузию POI из экспрессирующей клетки в соседнюю клетку и ее плотное прилегание к этой клетке. Если диффузии разрешено иметь место, и соседние клетки становятся «декорированными» секретируемым POI, то разделение клеток на основе степени декорирования POI не сможет дифференцировать клетки с высоким уровнем экспрессии от клеток с низким уровнем экспрессии, и может не эффективно отделять экспрессирующие от не экспрессирующих клеток.

Следовательно, одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является блокирование диффузии секретируемого POI

между соседними клетками. Это может быть достигнуто путем добавления блокирующей молекулы, которая связывается или с захватывающей молекулой клеточной поверхности захвата, или POI, и предотвращает связывание секретируемого POI с захватывающей молекулой клеточной поверхности. В этом аспекте детекторные молекулы не связываются с блокирующей молекулой. Например, если рецептором клеточной поверхности является hFcγRI, а секретируемый POI имеет Fc-фрагмент IgG человека, то диффузия секретируемого POI между соседними клетками может быть заблокирована добавлением экзогенного IgG крысы в культуральные среды. Детектирование клеток, представляющих секретируемый POI на своей поверхности, но не связанный IgG крысы, достигается за счет использования антител, специфических в отношении Fc IgG человека, которые не распознают IgG крысы. В другом варианте осуществления связывание секретируемого POI между соседними клетками уменьшают посредством увеличения вязкости сред.

В одном варианте осуществления этого изобретения не допускается накапливание секретируемого POI в средах. Это может быть достигнуто путем регуляции экспрессии секретируемого POI и/или захватывающей молекулы клеточной поверхности, так чтобы недолгая экспрессия POI приводила к достаточному количеству POI для связывания с захватывающей молекулой клеточной поверхности, но недостаточным количествам для диффузии. В другом варианте осуществления клетки могут быть удалены из сред, содержащих накопленный POI, связанный с клетками POI снимают, и допускают продолжение экспрессии POI в течение ограниченного периода времени, так что секретируемый POI не накапливается в средах. Белки могут быть сняты с помощью способов, известных в данной области техники, например, промывки клеток буфером с низким pH.

В соответствии с этим изобретением те клетки в клеточной популяции, которые связываются больше всего с детекторными молекулами, также экспрессируют больше всего секретируемый POI. В самом деле, чем большее количество POI секретирует отдельная клетка, тем большее количество POI представлено на поверхности клеток. Эта корреляция между количеством представленного на

поверхности POI и уровнем экспрессии POI в этой клетке позволяет быстро идентифицировать клетки с желаемым относительным уровнем экспрессии из популяции клеток.

В одном варианте осуществления библиотека ДНК может быть использована для экспрессии секретируемого белка, который может быть представлен на поверхности клетки с помощью захватывающей молекулы клеточной поверхности. Например, библиотеку ДНК можно также создать из кодирующих областей вариабельных доменов антител из В-клеток, выделенных из иммунизированных животных. Библиотеку ДНК можно затем экспрессировать в клетке, которая экспрессирует захватывающую молекулу клеточной поверхности, специфическую для антител, так что клоны желаемой специфичности, изотипа или авидности могут быть идентифицированы и выделены с помощью способа настоящего изобретения. В другом варианте осуществления библиотеку ДНК можно создать из кодирующих областей вариабельных доменов Т-клеточных рецепторов из Т-клеток, и слить, например, с Fc, способным связываться с Fc-связывающим белком. Библиотеку ДНК можно затем экспрессировать в клетке, которая экспрессирует Fc-связывающий белок, так что клоны нужной специфичности, изотипа или авидности могут быть идентифицированы и выделены, как здесь описано.

В другом варианте осуществления могут быть созданы трансгенные млекопитающие, которые экспрессируют конкретную захватывающую молекулу клеточной поверхности в одном или более типов клеток. Клетки из таких трансгенных млекопитающих могут быть затем подвергнуты скринингу непосредственно в отношении продукции POI. Например, может быть желательной экспрессия захватывающей молекулы клеточной поверхности, специфической в отношении антител, в плазматических клетках. Соответственно, плазматические клетки из иммунизированных мышей могут быть получены, и эти клетки, продуцирующие антитела, специфические в отношении желаемого антигена, могут быть выделены с помощью способа настоящего изобретения.

В дальнейшем варианте осуществления настоящего изобретения продукцию антител измеряют посредством использования линии

клеток CHO, которые экспрессируют рецептор FcγR1 (FcγRI) человека, который связывает конкретное антитело или TCR-Fc, которое представляет собой POI.

В другом аспекте настоящего изобретения представляющий интерес белок включает один или более вариабельных доменов Т-клеточных рецепторов или растворимый Т-клеточный рецептор. Один или более вариабельных доменов Т-клеточного рецептора могут быть ковалентно связаны с составляющей, которая может связываться с захватывающим белком клеточной поверхности. В конкретном варианте осуществления один или более вариабельных доменов Т-клеточного рецептора слиты с последовательностью Fc, например, последовательностью Fc человека, и захватывающим белком клеточной поверхности является Fc-рецептор, например, FcγR.

Общие структуры вариабельных доменов TCR известны (см., например, Lefranc and Lefranc (2001) The T Cell Receptor FactsBook, Academic Press, который включен сюда посредством ссылки; см., например, с 17-20; см. также Lefranc et al. (2003) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains, Developmental and Comparative Immunology 27: 55-77, и Lefranc et al. (2005) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains, Developmental and Comparative Immunology 29: 185-203, каждый из которых включен сюда посредством ссылки). В одном варианте осуществления вариабельный домен TCR из TCR-Fc включает N-концевую область, содержащую вариабельный домен из 104-125 аминокислот. В другом варианте осуществления TCR-Fc, кроме того, включает константную область TCR, включающую 91-129 аминокислот. В другом варианте осуществления TCR-Fc, кроме того, включает соединяющий пептид, включающий 21-62 аминокислот.

В одном варианте осуществления последовательность Fc сливают непосредственно или через линкер с вариабельным доменом TCR. В другом варианте осуществления TCR-Fc включает

вариабельную область TCR и константную область TCR, и последовательность Fc сливают непосредственно или через линкер с константной областью TCR. В другом варианте осуществления TCR-Fc включает вариабельную область TCR, константную область TCR и соединяющий пептид, и последовательность Fc сливают непосредственно или через линкер с соединяющим пептидом.

sTCR, TCR-Fc или слитый белок, включающий один или более вариабельных доменов Т-клеточного рецептора, может быть выбран, чтобы специфически связываться с представляющим интерес антигеном, например, веществом, продуцируемым опухолевой клеткой, например, веществом опухолевой клетки, которое способно вызывать иммунный ответ у хозяина. В конкретном варианте осуществления антиген представляет собой антиген, который присутствует на поверхности опухолевой клетки (т.е. опухолевый антиген) и распознается Т-клеткой, и который вызывает иммунный ответ у хозяина. Опухолевые антигены включают, например, альфафетопротеин (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), MUC-1, эпителиальный опухолевый антиген (ETA), тирозиназу (например, в случае злокачественной меланомы), связанный с меланомой антиген (MAGE), и мутантные или аномальные формы других белков, таких как, например, ras, p53 и т.д.

В одном варианте осуществления POI представляет собой TCR-Fc, и TCR-Fc включает вариабельную область α-цепи TCR, слитую с последовательностью Fc, и β-цепь TCR, слитую с последовательностью Fc (каждая из которых слита непосредственно или через линкер), причем слияние α-цепь TCR-Fc и слияние β-цепь TCR-Fc объединяются с образованием αβ TCR-Fc. В конкретном варианте осуществления αβ TCR-Fc включает следующие два полипептида: (1) вариабельную область α-цепи TCR, слитую с константной областью α-цепи TCR, слитой с последовательностью Fc, и (2) вариабельную область β-цепи TCR, слитую с константной областью β-цепи TCR, слитой с последовательностью Fc.

В другом варианте осуществления POI представляет собой

TCR-Fc, содержащий вариабельную область α-цепи TCR и вариабельную область β-цепи TCR и, необязательно, константную область α-цепи TCR и/или константную область β-цепи TCR. В конкретном варианте осуществления TCR-Fc кодируется нуклеиновой кислотой, включающей (5'→3') последовательность вариабельной области α-цепи TCR, за которой необязательно следует последовательность константной области α-цепи TCR, последовательность вариабельной области β-цепи TCR, за которой необязательно следует последовательность константной области β-цепи TCR, необязательно линкер, а затем последовательность Fc. В конкретном варианте осуществления TCR-Fc кодируется нуклеиновой кислотой, включающей (5'→3') последовательность вариабельной области β-цепи TCR, за которой необязательно следует последовательность константной области β-цепи TCR, последовательность вариабельной области α-цепи TCR, за которой необязательно следует последовательность константной области α-цепи TCR, необязательно линкер, а затем последовательность Fc. В различных вариантах осуществления конструкциям, кодирующим TCR-Fc, предшествуют сигнальные последовательности, например, сигнальные последовательности секреции, что делает их секретируемыми.

В другом варианте осуществления POI представляет собой TCR-Fc, и TCR-Fc включает TCR-Fc, включающий γ-цепь TCR, слитую с последовательностью Fc, и вариабельную область δ-цепи TCR, слитую с последовательностью Fc, с образованием γδ TCR-Fc. В конкретном варианте осуществления γδ TCR-Fc включает следующие два полипептида: вариабельную область γ-цепи TCR, слитую с константной областью γ-цепи TCR, слитой с последовательностью Fc, и (2) вариабельную область δ-цепи TCR, слитую с константной областью δ-цепи TCR, слитой с последовательностью Fc.

Вариабельные области Т-клеточного рецептора можно идентифицировать и/или клонировать любым способом, известным в данной области техники. Вариабельные области Т-клеточного

рецептора из представляющего интерес белка могут быть получены, например, путем экспрессии в клетке реаранжированной ДНК вариабельной области Т-клеточного рецептора, например, слитой с последовательностью Fc человека. Реаранжированные вариабельные области Т-клеточного рецептора, специфические в отношении конкретного антигена, могут быть получены любым подходящим способом, известным в данной области (см. ссылки ниже), например, путем подвергания мыши воздействию антигена и выделения Т-клеток из мыши, создания гибридом Т-клетки мыши и скрининга гибридом с использованием представляющего интерес антигена для получения представляющей интерес гибридомы. Реаранжированные вариабельные области Т-клеточного рецептора, специфические в отношении представляющего интерес антигена, могут быть клонированы, исходя из представляющих интерес гибридом(ы). Вариабельные области Т-клеточного рецептора, специфические в отношении антигена, можно также идентифицировать, используя технологию фагового дисплея, например, как это предусмотрено в ссылках ниже. Вариабельные области можно затем клонировать и слить, например, с Fc человека, для получения представляющего интерес белка, который может связываться с захватывающей молекулой клеточной поверхности, которая представляет собой FcγR.

Методы идентификации и/или клонирования вариабельных областей Т-клеточного рецептора описаны, например, в патенте США № 5635354 (праймеры и методы клонирования); Genevee et al. (1992) An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (Vα1-w29/Vβ1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction, Eur. J. Immunol. 22: 1261-1269 (праймеры и методы клонирования); Gorski et al. (1994) Circulating T Cell Repertoire Complexity in Normal Individuals and Bone Marrow Recipients Analyzed by CDR3 Size Spectratyping, J. Immunol. 152: 5109-5119 (праймеры и методы клонирования); Johnston, S. et al. (1995) A novel method for sequencing members of multi-gene families, Nucleic Acids Res. 23/15: 3074-

3075 (праймеры и методы клонирования); Pannetier et al. (1995) T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples, Immunology Today 16/4:176-181 (методы клонирования); Hinz, T. and Kabelitz, D. (2000) Identification of the T-cell receptor alpha variable (TRAV) gene(s) in T-cell malignancies, J. Immunol. Methods 246: 145-148 (методы клонирования); van Dongen et al. (2002) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: патент США № 6623957 (способы клонирования и праймеры); Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936, Leukemia 17: 2257-2317 (праймеры и методы клонирования); Hodges et al. (2002) Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes, J. Clin. Pathol. 56: 1-11 (методы клонирования); Moysey, R. et al. (2004) Amplification and one-step expression cloning of human T cell receptor genes, Anal. Biochem. 326: 284-286 (методы клонирования); Fernandes et al. (2005) Simplified Fluorescent Multiplex PCR Method for Evaluation of the T-Cell Receptor Vβ-Chain Repertoire, Clin. Diag. Lab. Immunol. 12/4: 477-483 (праймеры и методы клонирования); Li, Y. et al. (2005) Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display, Nature Biotech. 23/3: 349-354 (праймеры и методы клонирования); Wlodarski et al. (2005) Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia, Blood 106/8: 2769-2780 (методы клонирования); Wlodarski et al. (2006) Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome, Blood 108/8: 2632-2641 (праймеры и методы клонирования); Boria et al. (2008) Primer sets for cloning the human repertoire of T cell Receptor Variable regions, BMC Immunology 9:50 (праймеры и методы клонирования); Richman, S. and Kranz, D. (2007) Display, engineering, and applications of antigen-specific T cell receptors, Biomolecular

Engineering 24: 361-373 (методы клонирования). Примеры sTCR представлены, например, в патентах США № 6080840 и 7329731; и Laugel, B et al. (2005) Design of Soluble Recombinant T Cell Receptors for Antigen Targeting and T Cell Inhibition, J. Biol. Chem. 280: 1882-1892; которые включены сюда посредством ссылки. Fc-последовательности описаны здесь; примеры Fc-последовательностей и их использование в слитых белков представлены, например, в патенте США № 6927044, выданном Stahl и др. Все из вышеприведенных ссылок включены сюда посредством ссылки.

В дальнейшем варианте осуществления настоящего изобретения захватывающая молекула клеточной поверхности предназначена для взаимодействия с теми представляющими интерес белками, которые обычно не способны связываться с достаточным сродством и связываются с низкой сродством с захватывающей молекулой FcγR, и представления их на поверхности. Эти представляющие интерес белки включают молекулы IgG4 и IgG2. Соответственно, модульная захватывающая молекула была разработана и создана на основе ScFv-домена, слитого с трансмембранным (TM) и цитоплазматическим доменом FcγR. ScFv-домен был получен из антитела против Fc человека с высоким сродством и содержит вариабельный домен тяжелой цепи, слитый с вариабельным доменом легкой цепи. Трансмембранный-цитоплазматический домен FcγR был использован, чтобы обеспечить надлежащую вставку и ориентацию в плазматической мембране. Слитый белок ScFv-FcγR-TM-cyto способен связываться с IgG4 и другими Fc-содержащими молекулами, а также подтипами IgG2 и IgG1, и такими гетеродимерными молекулами (например, биспецифическими антителами), которые включают по меньшей мере один CH3-домен дикого типа, причем другой CH3-домен может содержать замену Fc*-типа.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения захватывающая молекула клеточной поверхности предназначена для взаимодействия с теми представляющими интерес белками, которые содержат модифицированный CH3-домен, например, полипептид Fc*,

который включает аминокислотные замены H95R и Y96F (нумерация основана на системе нумерации IMGT), например, SEQ ID NO: 42, и представления их на поверхности. Эти представляющие интерес белки включают биспецифические антитела, например, антитела в виде гетеротетрамеров, которые полезны при получении биспецифических антител, в общем описаны в публикации заявки на патент США № US 2010/0331527 A1, 30 декабря 2010, которая включена сюда в ее полном объеме посредством ссылки. Соответственно, модульная захватывающая молекула была разработана и создана на основе ScFv*-домена, слитого с трансмембранным (TM) и цитоплазматическим доменом FcγR. ScFv*-домен был получен из антитела против Fc* с высоким сродством и содержит вариабельный домен тяжелой цепи, слитый с вариабельным доменом легкой цепи. Трансмембранный-цитоплазматический домен FcγR был использован, чтобы обеспечить надлежащую вставку и ориентацию в плазматической мембране. Слитый белок ScFv*-FcγR-TM-cyto связывается с любой Fc*-содержащей молекулой, например, IgG3 дикого типа и гетеродимерами IgG4, IgG2 и IgG1, которые содержат по меньшей мере одну последовательность полипептида Fc*.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры предлагаются для предоставления специалистам в данной области техники полного раскрытия и описания, как изготовить и использовать способы и композиции настоящего изобретения, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы считают своим изобретением. Были предприняты усилия, чтобы обеспечить точность в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но некоторые экспериментальные ошибки и отклонения должны учитываться. Если не указано иное, части являются весовыми частями, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура представлена в градусах Цельсия, и давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1

Конструирование pTE084. pTE084 конструировали посредством

лигирования XbaI-фрагмента размером 1436 п.о. из pCAE100, которая кодирует FcγRI человека (hFcγRI; номер доступа в GenBank: M21091) в сайт для XbaI в pRG821. Ориентацию hFcγRI в желательных плазмидах в результате лигирования исследовали с помощью рестрикционного картирования с использованием NotI, PstI, EcoRI и StuI. pTE084 была разработана для экспрессии на высоком уровне hFcγRI, рецептора клеточной поверхности с высоким сродством к Fc-домену IgG человека. Она содержит две независимые экспрессионные кассеты. Одной кассетой является ген hFcγRI под контролем промотора CMV-MIE, а второй кассетой является ген неомицин-фосфотрансферазы II (NPT), который придает устойчивость к G418, под контролем позднего промотора SV40.

Конструирование производного CHO K1, которое экспрессирует hFcγRI. Клетки CHO K1 (4×10^6) трансфицировали pTE084, используя Lipofectamine™ (Life Technologies; Rockville, MD), следуя указаниям производителя. Клетки помещали в культуральную среду (10% фетальной бычьей сыворотки, 90% F-12 Хэма, 2 мМ L-глутамина, все реагенты были от Life Technologies, Rockville, MD), содержащую 500 мкг/мл G418 (Life Technologies), на 15 дней. Клетки, которые переживали отбор с использованием G418, обрабатывали трипсином, объединяли и окрашивали конъюгированным с FITC Fc-фрагментом IgG человека (FITC-hFc; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Вкратце, клетки, выращенные на 10-см чашках для культивирования, промывали один раз забуференным фосфатом солевым раствором Дульбекко (PBS) без хлорида кальция и хлорида магния (Life Technologies). Три миллилитра 0,25% трипсина (Life Technologies) добавляли в каждую чашку. Чашки вращали до отсоединения клеток от чашки. Десять миллилитров культуральной среды сразу же добавляли в каждую чашку с отсоединенными клетками. Затем клетки собирали путем центрифугированием при 1000 × g в течение 4 минут. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в 4 мл 2 мкг/мл FITC-hFc, разведенного в культуральной среде. Затем клетки помещали на платформу шейкера и окрашивали в течение одного

часа при комнатной температуре. Для удаления не связавшегося FITC-hFc клетки дважды промывали 20 мл PBS. Уровень метки FITC-hFc на клетках измеряли с помощью проточной цитометрии в клеточном сортера MOFLO™ (Cytomation; Fort Collins, CO). FITC-hFc не окрашивал ложнотрансфицированные родительские клетки CHO K1, но вызывал распределение флуоресценции в устойчивом к G418, pTE084-трансфицированном пуле. Первый 1% больше всего флуоресцирующих клеток из отобранного пула помещали в 96-луночные планшеты в количестве 1 клетка/лунку с использованием проточной цитометрии. Через девять дней 88 клеточных клонов в 96-луночных планшетах размножали в 24-луночных планшетах. Спустя 3 дня клетки в отдельных лунках промывали один раз 1 мл PBS, окрашивали 0,5 мл 2 мкг/мл FITC-hFc в течение 1 часа, дважды промывали 1 мл PBS и исследовали на окрашивание клеточной поверхности под флуоресцентным микроскопом. Тридцать три самых флуоресцирующих клонов были отобраны, размножены, затем подвергнуты скринингу с помощью проточной цитометрии.

Диффузия секретируемого белка между экспрессирующими клетками и не экспрессирующими клетками среди клеток была блокирована путем добавления IgG: Поскольку все клетки в hFcγRI клональной клеточной линии экспрессируют hFcγRI клеточной поверхности, все они обладают способностью связывать IgG или слитые белки, состоящие из Fc-домена IgG. Поскольку hFcγRI связывает IgG различных видов (van de Winkel and Anderson, 1991)), набор IgG животных был проверен на способность блокировать связывание белка, содержащего Fc IgG1 человека (hIgG1)-метку (4SC622) с hFcγRI-экспрессирующими клетками. 4SC622 является химерной молекулой, состоящей из экстраклеточного домена IL-2Rγ, слитого с экстраклеточным доменом hIL-4Rγ, который затем слит с Fc-доменом hIgG1. В этом эксперименте культуры RGC1, линию hFcγRI-экспрессирующих клеток, выбранную исходя из клеток CHO K1, которые были стабильно трансфицированы pTE084, инкубировали с 1 мкг/мл 4SC622 в течение 18 часов в присутствии или в отсутствие 1 мг/мл IgG различных видов в термостате для культур тканей при

37°C.

Связывание 4SC622 с клеточной поверхностью определяли с помощью проточной цитометрии после того, как промытые клетки были окрашены конъюгированным с фикоэритрином, направленным против IgG1 мыши моноклональным антителом AG184 (PE-AG184), специфическим для компонента hIL-2Rγ из 4SC622 (BD Pharmingen, San Diego, CA), следуя процедуре, изложенной для окрашивания клеток FITC-hFc.

Было установлено, что hIgG полностью блокирует связывание 4SC622 с hFcγR1, представленным на поверхности RGC1. Полученный от крысы, кролика и собаки IgG также эффективно блокировал связывание, тогда как полученный от коров и овец IgG не блокировал такое связывание. Способность добавляемого извне IgG крысы к блокированию связывания добавляемого извне Fc hIgG1-меченного белка (4SC622) с hFcγRI клеточной поверхности предполагает, что IgG крысы также может блокировать перенос между клетками, экспрессирующими Fc hIgG1-меченный белок на различных уровнях. Для проверки этого две линии клеток, которые можно различить по присутствию или отсутствию зеленого флуоресцентного белка (EGFP), были созданы, исходя из RGC1. Вкратце, для EGFP-мечения клеток RGC1, 2×10^6 клеток RGC1 котрансфицировали 0,5 мг PTE073, которая кодирует ген гигромицин B-фосфотрансферазы под контролем промотора фосфоглицераткиназы, и 5 мг pRG816-EGFP, которая кодирует ген EGFP под контролем промотора CMV-MIE. Трансфицированные клетки отбирали с использованием 200 мкг/мл гигромицина B (Sigma, St. Louis, MO) в течение двух недель. Зеленые флуоресцирующие клетки выделяли с помощью проточной цитометрии. Один экспресссирующий EGFP и hFcγRI клон, RGC2, был использован в экспериментах по смешиванию клеток. Другая линия клеток, используемая в этих экспериментах, RGC4, был создана с помощью стабильной трансфекции RGC1 плазмидой pEE14.1-622. pEE14.1-622 представляет собой плазмиду, в которой экспрессия 4SC622 находится под контролем промотора CMV-MIE и включает миниген глутаминсинтетазы, который придает устойчивость к аналогу

метионинсульфоксимина (MSX), и обеспечивает отбор событий стабильной интеграции. Клетки RGC4 экспрессируют hFcγRI на поверхности клеток и секретируют Fc hIgG1-меченный белок 4SC622. Один планшет со смешанными клетками, содержащими 50% клеток RGC2 и 50% RGC4, инкубировали с 1 мг/мл IgG крысы в течение 18 часов до окрашивания PE-AG184, затем исследовали с помощью проточной цитометрии. Обусловленная EGFP флуоресценция клеток RGC2 свидетельствует о том, что клетки RGC2 также связываются с добавленным извне 4SC622 (1 мкг/мл), на что указывает увеличении флуоресценции PE-AG184. RGC4 не светятся в дискриминационном окне для EGFP. Примечательно, что добавляемый извне IgG крысы не уменьшал процент клеток RGC4, которые были позитивными при окрашивании по 4SC622 на клеточной поверхности, предполагая, что связывание 4SC622 в hFcγRI произошло в то время, когда белки были в пути к поверхности клетки. При смешивании клеток RGC2 и RGC4, белок 4SC622, секретируемый из клеток RGC4, накапливался в среде и связывался больше всего с клетками RGC2. Однако добавление 1 мг/мл IgG крысы значительно уменьшало процент клеток RGC2, которые связывались с 4SC622, демонстрируя, что IgG крысы блокировал перенос секретируемого Fc hIgG1-меченного белка из экспрессирующих клеток в не экспрессирующие клетки.

Пример 2: Флуоресценция с клеточной поверхности коррелирует с уровнем экспрессии 4SC622

Клетки RGC1 (4×10^6) трансфицировали pEE14.1-622, и пул стабильных трансфектантов был получен после отбора в течение 2 недель в среде, состоящей из 10% диализованной фетальной бычьей сыворотки, 90% модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM) без глутамина, 1×GS добавки и 25 мкМ MSX (все реагенты были от JRH Biosciences, Lenexa, KS). IgG крысы добавляли в культуральную среду до 1 мг/мл за 18 ч до иммуноокрашивания. Клетки обрабатывали трипсином, промывали PBS и окрашивали 1,5 мкг/мл FITC-конъюгированного $F(ab')_2$-фрагмента поликлонального антитела против IgG (H+L) человека (Jackson ImmunoResearch Laboratories) в течение одного часа при комнатной температуре,

следуя процедурам, описанным для окрашивания FITC-hFc в примере 1. Окрашивание клеток затем анализировали с помощью проточной цитометрии. Распределение флуоресценции предполагало, что выбранный пул содержит клетки с широким диапазоном уровней экспрессии 4SC622. Клетки первых 3% (группы R3), 7-11% (группы R5) и 15-19% (группы R7), с точки зрения их иммунофлуоресценции, разделяли на три пула и размножали в течение 9 дней. Среднюю продукцию 4SC622 в каждой клетке для пулов определяли путем измерения количества клеток и уровней 4SC622 в средах после выращивания в течение 3 дней с помощью иммуноанализа Pandex (Idexx; Westbrook, ME), следуя рекомендациям производителя. В анализе Pandex, полистироловые частицы для анализа Fluoricon, покрытые козьим антителом против IgG человека, специфическим в отношении γ-цепи (Sigma), использовали для захвата 4SC622 из среды, и конъюгированное с FITC козье антитело против IgG человека, Fc-специфическое (Sigma), использовали для детектирования связанного с частицами 4SC622. Известные количества очищенного 4SC622 включали в анализ для калибровки. Клетки первых 3%, 7-11% и 15-19% пула, как было установлено, продуцируют 4SC622 на уровне, составляющем 1,42, 0,36 и 0,22 пг/клетку/день, соответственно. Таким образом, существовала корреляция между окрашиванием 4SC622 клеточной поверхности и конкретной продукцией белка. Этот результат позволяет предположить, что отдельные клетки, которые экспрессируют 4SC622 на высоких уровнях, можно получить путем выделения клеток, которые были окрашены наиболее ярко FITC-конъюгированным $F(ab')_2$-фрагментом поликлонального антитела против IgG (H+L) человека.

Пример 3: Выделение экспрессирующих клонов в RGC1: IL-4 Trap

Для непосредственной демонстрации эффективности создания клональных клеточных линий с высоким уровнем продукции секретируемого белка с помощью методики авторов настоящего изобретения были созданы клональные, 4SC622-продуцирующие клеточные линии, исходя из RGC1. Клетки RGC1 (4×10^6)

трансфицировали pEE14.1-622 и отбирали в течение двух недель с использованием 25 мкМ MSX для получения пула стабильных трансфектантов. MSX-резистентные клетки объединяли и инкубировали с 1 мг/мл IgG человека в течение 18 часов до окрашивания PE-AG184. Шесть клеток из первых 5% окна, как определено с помощью анализа с использованием проточной цитометрии окрашивания 4SC622 клеточной поверхности, были выделены и размножены. Продукцию 4SC622 из шести клональных линий определяли и сравнивали с продукцией 4SC622 из клонов, полученных с помощью отбора вручную, с последующим клонированием методом разведений и амплификацией отобранных колоний. Один происходящий от RGC1 клон, RGC4, продуцировал 4SC622 на уровне 12 пг/клетка/день. Этот уровень соответствует таковому наилучшего продуцента 4SC622, выделенного с помощью отбора вручную и анализа 2700 клонов. Таким образом, по сравнению с колониями ручного отбора, методология, описанная в этом изобретении, оказывается гораздо более эффективной при скрининге и клонировании сильных продуцентов.

VEGF Trap. Плазмиды pTE080 и pTE081 кодируют гены для VEGF Trap, hVEGF-R1R2 и hVEGF-R1R3. hVEGF-R1R2 представляет собой химерную молекулу, состоящую из первого Ig домена hVEGFRI, слитого со вторым Ig доменом hVEGFR2 который затем слит с hIg1FC-доменом. hVEGF-R1R3 представляет собой химерную молекулу, состоящую из первого Ig домена hVEGFRI, слитого со вторым Ig доменом hVEGFR3 который затем слит с hIgG1FC-доменом. В этих плазмидах ген для VEGF Trap находится под контролем промотора CMV-MIE, и миниген глутаминсинтетазы, который придает устойчивость к MSX, экспрессируют для отбора событий стабильной интеграции. Клетки RGC1 трансфицировали одной из двух этих плазмид и выращивали в среде, содержащей 25 мкМ MSX, в течение 2 недель, чтобы отобрать клетки, в которых плазмида была стабильно интегрирована. MSX-резистентные клетки инкубировали с 0,1 мкг/мл IgG2a и IgG3 мыши в течение 18 часов до окрашивания 1,5 мкг/мл FITC-конъюгированного $F(ab')_2$-фрагмента поликлонального антитела против IgG (H+L) человека. Клетки окрашивали в течение 1 часа, затем дважды промывали PBS перед

проточной цитометрией. Отдельные клетки были распределены по 96-луночным планшетам для культивирования тканей из пула клеток, флуоресценция которых была одной из самых высоких, в первом 1%. Клетки в отдельных лунках размножали, и их продуктивность определяли с помощью анализов Pandex. Происходящие от RGC клоны, экспрессирующие как hVEGF-R1R2, так и hVEGF-R1R3, имели более высокую удельную продуктивность и были выделены путем скрининга меньшего количества клонов по сравнению с экспрессирующими на самом высоком уровне, отобранными вручную, MSX-устойчивыми колониями. См. таблицу 1.

Таблица 1

	Сравнение удельной продуктивности				
Белок	Транзиент (мкг/мл)	Стабильные линии клеток CHO K1, отобранные вручную		Стабильные линии клеток, происходящие от RGC1	
		Удельная продуктивность (пг/клетку/день)	# скрининг-рованных клонов	Удельная продуктивность (пг/клетку/день)	# скрининг-рованных клонов
4SC622	1,1	12	2700	12	6
hVEGF-R1R2	33	68	190	77	62
hVEGF-R1R3	27	5	100	22,6	42

Пример 4: Связанный с клеточной поверхностью Fc hIgG1-меченный белок интернализуется RGC1

hFcγRI, как известно, индуцирует интернализацию связанного с клеточной поверхностью его лиганда. Для анализа того, могли ли клетки RGC1 интернализировать связанный с клеточной поверхностью 4SC622, 1 мкг/мл 4SC622 добавляли к клеткам RGC1 на 1 час, а затем клетки сразу же обрабатывали для иммуноокрашивания 4SC622 с использованием PE-AG184 и анализа с помощью проточной цитометрии. Девяносто три процента клеток были положительными при окрашивании по 4SC622 клеточной поверхности. В качестве альтернативы, 1 мкг/мл 4SC622 добавляли

к клеткам RGC1 на 1 час, затем клетки промывали и инкубировали в культуральной среде без 4SC622 с PE-AG184 в течение 18 часов. Анализ с помощью проточной цитометрии после иммуноокрашивания на 4SC622 показал, что 9% клеток сохраняли 4SC622 на клеточной поверхности. Для дополнительной характеристики потерь связанного с поверхностью 4SC622, очищенный белок 4SC622 добавляли в среды для RGC1 и родительских клеток CHO K1, затем уровни 4SC622 в средах измеряли в динамике по времени. Уровень 4SC622, добавленного до 2 мкг/мл в культуральную среду в 10-см чашке, был значительно ниже в RGC1-кондиционированной среде после инкубации в течение 3 дней по сравнению с контролем CHO K1. Эти результаты показывают, что концентрация 4SC622 в культуральной среде уменьшается в присутствии hFcγRI на клеточной поверхности. Полученные результаты свидетельствуют о том, что истощение 4SC622 из среды было результатом интернализации комплекса hFcγRI-4SC622. Эта интернализация комплексов рецептор-лиганд может облегчить эффективное удаление всех 4SC622 из не экспрессирующих клеток в присутствии блокирующего IgG в течение 18-часовой стадии блокирования.

Пример 5: Создание линий клеток CHO K1 с индуцируемой экспрессией hFcγRI

Основанные на проточной цитометрии методы захвата аутологичной секреции (FASTR™), в которых используется hFcγRI, позволяют быстро выделить клоны с высоким уровнем экспрессии. Однако, если hFcγRI опосредует кругооборот Fc-меченных белков, то осуществляемая продукция секретируемого белка сконструированными, экспрессирующими hFcγRI клетками была бы выше, если экспрессию hFcγRI можно было бы подавить во время периода продукции. С этой целью была создана линия клеток CHO K1, в которой экспрессия hFcγRI индуцируется с помощью тетрациклина или аналога доксициклина. В этой системе клетки CHO K1, которые экспрессируют белок-тетрациклиновый репрессор (TetR), сначала были созданы, и hFcγRI был помещен под транскрипционный контроль промотора, активность которого

регулировалась TetR. Два тандемных TetR-оператора (TetO) были размещены непосредственно после (3') промотора/усилителя CMV-MIE в pTE084 для создания pTE158. TetR блокировал транскрипцию hFcγRI с промотора CMV-MIE в pTE158 в отсутствие тетрациклина или какого-либо другого подходящего индуктора. В присутствии индуктора белок TetR был неспособен к связыванию TetO, и происходила транскрипция hFcγRI.

Клетки CHO K1 трансфицировали pcDNA6/TR, плазмидой, которая придает устойчивость к бластицидину, в которой экспрессия TetR происходит с промотора CMV-MIE (Invitrogen; Carlsbad, CA). После отбора в течение двух недель с использованием 2,5 мкг/мл бластицидина (Invitrogen), стабильные трансфектанты были объединены. Этот пул затем трансфицировали pTE158, плазмидой, которая придает устойчивость к G418, в которой экспрессия hFcγRI зависит от гибридного промотора CMV-MIE/TetO. Клетки, последовательно трансфицированные pcDNA6/TR и pTE158, отбирали с использованием 400 мкг/мл G418 и 2,5 мкг/мл бластицидина в течение 12 дней, затем объединяли. Пул индуцировали в течение двух дней путем добавления 1 мкг/мл доксициклина, затем окрашивали FITC-hFc для идентификации клеток, которые экспрессируют hFcγRI. Первые 5% клеток, экспрессирующих hFcγRI, собирали в пул, размножали в течение 6 дней в отсутствие доксициклина и снова окрашивали FITC-hFc на присутствие hFcγRI. Клетки, которые не были положительными при окрашивании по hFcγRI, собирали и размножали в культуральной среде, содержащей 1 мкг/мл доксициклина, в течение трех дней. Затем пул окрашивали на присутствие hFcγRI и выделяли с помощью проточной цитометрии. Клетки, которые экспрессировали hFcγRI на высоком уровне, (первый 1%) распределяли по 96-луночным планшетам в количестве одна клетка на лунку. Эти клетки, предположительно, содержали клетку, которая характеризовалась низкими уровнями не индуцированной экспрессии FcγR1 и высокими уровнями индуцируемой экспрессии FcγR1. После размножения подтверждали индукцию hFcγRI доксициклином в 20 клонах с

помощью иммуноокрашивания с использованием FITC-hFc и проточной цитометрии. Один клон был выбран для дальнейшего исследования и назван RGC10.

В отсутствие доксициклина RGC10 не экспрессировал hFcγRI на выявляемых уровнях, тогда как высокие уровни hFcγRI отмечались в клетках, которые были подвергнуты индукции с помощью 1 мкг/мл доксициклина в течение трех дней. Средняя флуоресценция клеток RGC10 увеличивалась более чем в 1000 раз после индукции доксициклином.

Пример 6: Выделение 4SC622-продуцирующих клеточных линий, исходя из RGC10

Клетки RGC10 трансфицировали pEE14.1-622, и MSX-резистентные клетки объединяли после отбора с использованием 25 мМ MSX в течение двух недель. Экспрессию hFcγRI индуцировали добавлением 1 мкг/мл доксициклина в культуральную среду на три дня. Один мг/мл IgG крысы добавляли в культуральную среду, содержащую доксициклин, за 18 часов до окрашивания FITC-конъюгированным $F(ab')_2$-фрагментом поликлонального антитела против IgG (H+L) человека и анализа с помощью проточной цитометрии. Клетки, которые экспрессировали 4SC622 на самых высоких уровнях (первый 1%), распределяли по 96-луночным планшетам в количестве одна клетка на лунку. Без индукции экспрессии hFcγRI доксициклином, с помощью окрашивания FITC-конъюгированным $F(ab')_2$-фрагментом поликлонального антитела против IgG (H+L) человека не удается детектировать связанный с клеточной поверхностью 4SC622. Шестьдесят клонов были размножены в отсутствие доксициклина. Удельную продуктивность 13 самых лучших продуцентов определяли с помощью анализа Pandex. Удельная продуктивность клона 1C2 составляла 17,8 пг/клетку/день, что значительно выше составляющей 12 пг/клетку/день продуктивности, отмечаемой в случае лучшей линии клеток 4SC622, ранее выделенной, используя линию клеток с нерегулируемым hFcγRI - RGC1.

Пример 7: Могут быть созданы клетки миеломы SP2/0, которые экспрессируют захватывающий белок клеточной поверхности

В этом примере была создана линия миеломных клеток Sp2/0-Ag14, которая стабильно экспрессирует hFcγRI, для демонстрации того, что способ захвата аутологичной секреции применим к клеточным линиям, отличным от CHO. Ген hFcγRI вводили в клетки миеломы с помощью инфицирования ретровирусами. Плазмиду pLXRN (Clontech; Palo Alto, CA), ретровирусный ДНК-вектор, в котором представляющий интерес ген может быть экспрессирован с расположенного 5′ промотора длинного концевого повтора вируса саркомы у мыши Молони (LTR MoMuSV), использовали для создания ретровируса, кодирующего ген hFcγRI. XhoI-фрагмент размером 1363 п.о. из pTE084, кодирующий ген hFcγRI человека, клонировали в сайт для XhoI pLXRN. Плазмида, в которой экспрессия кДНК для hFcγRI зависит от LTR MoMuSV, была выбрана и названа pTE255.

Политропный ретровирус для экспрессии hFcγRI был создан существу, следуя предписаниям производителя. Линию пакующих клеток GP-293, линию клеток на основе HEK 293, которая стабильно экспрессирует вирусные белки gag и pol (Clontech; Palo Alto, CA), котрансфицировали 10 мг каждой из pVSV-G и pTE255. Плазмида pVSV-G позволяет экспрессировать вирусный белок оболочки VSV-G, который закрепляет за инфекционными частицами широкий ряд хозяев.

Конструирование Sp2-hFcγRI-4. Политропный ретровирус для экспрессии hFcγRI использовали для инфицирования 1×10^7 миеломных клеток Sp2/0-Ag14 (American Type Culture Collection; Manassas, VA) с множественностью, составляющей приблизительно 10 инфекционных частиц на клетку. Через три дня после инфицирования клетки окрашивали в течение 1 часа, затем дважды промывали PBS перед анализом с помощью проточной цитометрии. Эти клетки, экспрессирующие hFcγRI, на что указывал связанный FITC-hFc, собирали в пул с помощью проточной цитометрии. Пул размножали в течение 13 дней, после чего снова окрашивали FITC-hFc, и клетки, экспрессирующие hFcγRI, собирали в пул с помощью проточной цитометрии. Эти отсортированные клетки культивировали

в 10% фетальной бычьей сыворотке+90% модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM) с 4,5 г/л глюкозы и 4 мМ глутамина в течение 3 недель, окрашивали FITC-hFc, и клетки со средним уровнем флуоресценции в первом 1% популяции клонировали методом разбивки до одной клетки. После размножения 24 клона исследовали с помощью проточной цитометрии в отношении экспрессии hFcγRI, как описано выше, и один клон, SP2-hFcγRI-4, был выбран для определения дополнительных характеристик.

Выделение клеток Sp2-hFcγRI, экспрессирующих белок 4SC622. Клетки SP2-hFcγRI-4 (1×10^7) трансфицировали pTE209, плазмидой, которая позволяет конститутивно экспрессировать 4SC622 с промотора CMV-MIE и придает устойчивость к гигромицину. Трансфицированные клетки помещали в среду, содержащую 10% FCS, 90% D-MEM и 400 мкг/мл гигромицина, на 14 дней. Устойчивые к гигромицину клетки инкубировали с 1 мг/мл IgG кролика в течение восемнадцати часов до окрашивания FITC-конъюгированным $F(ab')_2$-фрагментом поликлонального антитела против IgG (H+L) человека. Клетки окрашивали в течение 1 часа, затем дважды промывали PBS перед анализом с помощью проточной цитометрии. Меченые клетки собирали в пул с помощью проточной цитометрии, затем культивировали в течение 5 дней и сортировали, как описано выше. Клетки из размноженного пула, которые связывались больше всего с FITC-конъюгированным $F(ab')_2$-фрагментом поликлонального антитела против IgG (H+L) человека, первый 1% популяции, затем клонировали методом разбивки до одной клетки. Продукцию 4SC622 из десяти клонов анализировали с помощью ELISA, и было установлено, что все 10 клонов экспрессируют 4SC622; клон 5H11 продуцировал 4SC622 на уровне 0,5 пг на клетку в день. Эти данные показали, что клоны, секретирующие 4SC622, были эффективно выделены с помощью метода захвата аутологичной секреции из гетерогенного пула клеток, полученного в результате стабильной трансфекции клеток Sp2-hFcγRI-4 pTE209.

Для подтверждения того, что 4SC622 был аутологично представлен на поверхности миеломных клеток, экспрессирующих как 4SC622, так и hFcγRI, клон 5H11 инкубировали с 1 мг/мл IgG

кролика в течение 18 часов, затем окрашивали FITC-конъюгированным $F(ab')_2$-фрагментом антитела против IgG (H+L) человека и, как было установлено, представляет 4SC622 на клеточной поверхности. Секретируемый белок представлялся в условиях, когда перекрестная подача была заблокирована с помощью IgG кролика, что свидетельствует об аутологичном представлении 4SC622. Эти данные свидетельствовали о том, что способ захвата аутологичной секреции, описанный выше, не ограничивался клетками CHO, а также может быть распространен на миеломные и другие типы клеток.

Пример 8. Включающий белок G химерный белок может функционировать в качестве захватывающего белка клеточной поверхности

Чтобы продемонстрировать применимость способа захвата аутологичной секреции к захватывающему белку клеточной поверхности, отличному от hFcγRI, была создана линия клеток, экспрессирующая белок G. Белок G, из Streptococcus штамма G148, связывается со всеми подклассами IgG человека и мыши, и как таковой применим для выделения рекомбинантных клеток, экспрессирующих антитела или слитые с Fc IgG белки. Чтобы продемонстрировать, что Fc IgG-связывающий домен белка G может использоваться в качестве захватывающего белка клеточной поверхности, способного связываться со всеми подклассами IgG мыши и человека, авторы настоящего изобретения создали линию клеток CHO, экспрессирующую химерный белок, состоящий из Fc-связывающего домена белка G, слитого с трансмембранным и внутриклеточным доменом hFcγRI. Fc-связывающий домен белка G содержит три гомологичных повтора длиной 55 аминокислот (Guss et al., (1986) EMBO 5: 1567 и Sjobring et al. (1991) J. Biol. Chem. 266: 399), и каждый повтор способен связывать один Fc IgG. Для увеличения экспрессии этого химерного белка в клетках CHO, авторы настоящего изобретения сконструировали синтетическую ДНК, в которой сигнальная последовательность из гена ROR1 мыши была слита с Fc-связывающим доменом, аминокислотами 303-497 белка G (# доступа X06173) (SEQ ID NO:

1). Эта синтетическая ДНК была получена путем сочетания отжига олигонуклеотидов, заполнения пробелов и ПЦР-амплификации. Синтетическую ДНК затем сливали, с помощью ПЦР, с ДНК, кодирующей трансмембранный и внутриклеточный домены, аминокислотами 279-374 (SEQ ID NO: 2), hFcγRI (№ доступа - M21091). Полученную ДНК, кодирующую химерный белок белок G/hFcγRI, клонировали в pTE158 ниже (3') промотора CMV-MIE, заменяя ген, кодирующий hFcγRI, с получением плазмиды pTE300.

Линию клеток CHO K1, адаптированную к росту в бессывороточной среде, RGC14, трансфицировали pTE300, и через три дня добавляли 400 мкг/мл G418 в культуральную среду для отбора стабильной интеграции pTE300. Через две недели после начала отбора клетки окрашивали FITC-hFc для идентификации клеток, экспрессирующих hFcγRI. Эти клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, и клетки, экспрессирующие hFcγRI, собирали в пул. Клетки размножали в течение 10 дней, и популяцию клеток, экспрессирующих hFcγRI, снова выделяли с помощью проточной цитометрии. Клетки снова размножали, окрашивали FITC-hFc, и отдельные клетки, экспрессирующие химерный белок белок G/hFcγRI на высоком уровне, выделяли с помощью проточной цитометрии. Отдельные клетки, которые были позитивными при окрашивании по связыванию с FITC-hFc, были отобраны в среде, состоящей из 10% фетальной бычьей сыворотки, 90% F12 Хэма и 400 мкг/мл G418. После инкубации в течение двух недель 48 клонов исследовали на связывание с бычьим IgG, присутствующим в культуральной среде, посредством окрашивания FITC-конъюгированным $F(ab')_2$-фрагментом антитела против бычьего IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Один клон, RGC18, который был позитивным при окрашивании этим антителом, был выбран для дальнейшей характеристики.

Выделение экспрессирующих клонов в RGC18: Клетки RGC18 (6×10^6) трансфицировали pTE209 и отбирали в отношении интеграции плазмиды с помощью выращивания в 400 мкг/мл гигромицина в течение 18 дней. Устойчивые к гигромицину клетки инкубировали с 1 мг/мл IgG кролика в течение восемнадцати часов

до окрашивания FITC-конъюгированным $F(ab')_2$-фрагментом поликлонального антитела против IgG (H+L) человека. Клетки окрашивали в течение 1 часа, затем дважды промывали PBS перед анализом с помощью проточной цитометрии. Самые флуоресцирующие клетки (первые 5%) были выделены методом разбивки до одной клетки и размножены в течение 3 недель. Десять клонов исследовали на секрецию 4SC622. Все исследованные клоны секретировали 4SC622 на высоком уровне, и самый лучший клон, RGC19, имел удельную продуктивность, составляющую 6,4 пг/клетку день. Этот результат показал, что 4SC622-экспрессирующие клетки эффективно выделены из гетерогенного пула клеток, полученного в результате стабильной трансфекции RGC18 pTE209, с помощью способа захвата аутологичной секреции. Кроме того, эти данные ясно показали, что может быть сконструирован фрагмент белка G, который включает сигнальную последовательность и трансмембранный домен и функционирует в качестве захватывающего белка клеточной поверхности.

Для подтверждения того, что 4SC622 был аутологично представлен на поверхности клеток RGC19, экспрессирующих как химерный белок белок G/hFcγRI, так и 4SC622, RGC19 инкубировали с 1 мг/мл IgG кролика в течение 18 часов, затем окрашивали FITC-конъюгированным $F(ab')_2$-фрагментом антитела против IgG (H+L) человека и анализировали с помощью проточной цитометрии. Клетки RGC19, как было установлено, имеют 4SC622 на клеточной поверхности в этих условиях, когда перекрестная подача была заблокирована с помощью IgG кролика, что свидетельствует об аутологичном представлении 4SC622. IgG кролика эффективно блокировал связывание экзогенного белка 4SC622 с клетками RGC18, но не блокировал представление 4SC622 на клеточной поверхности клеток, экспрессирующих 4SC622. Эти данные показали, что свойства химерного белка белок G/hFcγRI были схожими с таковыми hFcγRI в качестве захватывающего белка клеточной поверхности, и свидетельствовали о том, что в способе захвата аутологичной секреции могут использоваться другие белки в качестве захватывающих белков клеточной поверхности.

Пример 9: Выделение продуцирующих антитела клеток из RGC10

Чтобы продемонстрировать эффективность способа захвата аутологичной секреции для выделения линий клеток CHO, которые экспрессируют рекомбинантные антитела, авторы настоящего изобретения клонировали ДНК, кодирующую гены вариабельных областей легкой и тяжелой цепей, из гибридомы KD5. KD5 является гибридомой, которая экспрессирует моноклональное антитело, специфическое для Tie2-рецептора человека.

В последовательности генов константных областей IgG мыши были клонированы, исходя из 500 нг полиА$^+$ РНК селезенки мыши (Clontech, Palo Alto, CA). Одноцепочечную кДНК синтезировали, используя систему SuperScript First-Strand Synthesis System для ОТ-ПЦР, с использованием в качестве затравок случайных гексамеров в количестве 50 нг (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Последовательность ДНК для константной области легкой цепи каппа мыши (# доступа Z37499) амплифицировали, исходя из этой кДНК, с помощью ПЦР, используя праймеры 5' mCLK1 (Z37499) (5'-CGGGCTGATG CTGCACCAAC TGTATCCATC TTC-3') (SEQ ID NO: 3) и 3' mCLK1 (Z37499) (5'-ACACTCTCCC CTGTTGAAGC TCTTGACAAT GGG-3') (SEQ ID NO: 4). Последовательность ДНК для константной области IgG2a мыши (# доступа AJ294738) также амплифицировали, исходя из этой кДНК, с помощью ПЦР, используя праймеры 5' mCH2a (AJ294738) (5'-GCCAAAACAA CAGCCCCATC GGTCTATCCA C-3') (SEQ ID NO: 5) и 3′ mCH2a (AJ294738) (5'-TCATTTACCC GGAGTCCGGG AGAAGCTCTT AGTCG-3') (SEQ ID NO: 6). Продукты ПЦР клонировали в pCR2.1-TOPO, используя набор для клонирования TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), и подтверждали последовательность константных областей.

Гены вариабельных областей KD5 амплифицировали с помощью ОТ-ПЦР, исходя из мРНК гибридомы KD5, и клонировали в pCR2.1-TOPO, используя смеси праймеров для вариабельных областей тяжелой и легкой цепей от Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Ген вариабельной области тяжелой цепи подвергали ПЦР-амплификации, используя клонированную в pCR2.1-TOPO вариабельную область в качестве матрицы, с использованием праймеров 5' BspMI/KD5VH N-конец (5'-GAGAGTACCT GCGTCATGCA

GATGTGAAAC TGCAGGAGTC TGGCCCT-3') (SEQ ID NO: 7) и 3' BspMI/KD5VH C-конец (5'-GAGAGACCTG CGTCAGCTGA GGAGACGGTG ACCGTGGT-3') (SEQ ID NO: 8), расщепляли BspMI и лигировали с расщепленным BsaI фрагментом гена константной области тяжелой цепи IgG2a, амплифицированным с помощью ПЦР с использованием праймеров 5' BsaI/CH2a N-конец (5'-GAGAGGGTCT CACAGCCAAA ACAACAGCCC CATCG-3') (SEQ ID NO: 9) и 3' BsaI/CH2a C-конец (5'-GAGAGGGTCT CCGGCCGCTC ATTTACCCGG AGTCCGGG AGAA-3') (SEQ ID NO: 10). Затем этот фрагмент лигировали в сайты для BspMI и NotI pRG882. Полученная в результате плазмида, pTE317, была способна экспрессировать рекомбинантный ген тяжелой цепи KD5, слитый с сигнальной последовательностью mROR1, с промотора CMV-MIE. Ген вариабельной области легкой цепи амплифицировали с помощью ПЦР, используя клонированную в pCR2.1-TOPO вариабельную область в качестве матрицы, с использованием праймеров 5' BsmBI/KD5VL N-конец (5'-GAGAGCGTCT CATGCAGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA-3') (SEQ ID NO: 11) и 3' BsmBI/KD5VL C-конец (5'-GAGAGCGTCT CACAGCCCGT TTTATTTCCA GCTTGGTCCC-3') (SEQ ID NO: 12), расщепляли BsmBI и лигировали с расщепленным BsaI фрагментом гена константной области легкой цепи каппа, амплифицированным с помощью ПЦР с использованием праймеров 5' BsaI/CLK N-конец (5'-GAGAGGGTCT CAGCTGATGC TGCACCAACT GTATCC-3') (SEQ ID NO: 13) и 3' BsaI/CLK C-конец (5'-GAGAGGGTCT CAGGCCGCTC AACACTCTCC CCTGTTGAAG CTCTTGAC-3') (SEQ ID NO: 14). Затем этот фрагмент лигировали в сайты для BspMI и NotI pRG882. Полученная в результате плазмида, pTE316, была способна экспрессировать рекомбинантный ген легкой цепи KD5, слитый с сигнальной последовательностью mROR1, с промотора CMV-MIE.

EcoRI-NotI-фрагмент размером 1450 п.о. из pTE317, кодирующий ген тяжелой цепи KD5, клонировали в сайты для EcoRI и NotI pRG980, вектора, который придает устойчивость к гигромицину и позволяет экспрессировать рекомбинантные гены с промотора UbC, с получением плазмиды pTE322. Аналогично, EcoRI-NotI-фрагмент размером 750 п.н. из pTE316, кодирующий ген легкой цепи KD5, клонировали в сайты для EcoRI и NotI pRG985, вектора, который придает устойчивость к пуромицину и позволяет

экспрессировать рекомбинантные гены с промотора UbC, с получением плазмиды pTE324. Клетки RGC10 (5×10^6) трансфицировали 3 мкг pTE322 и 3 мкг pTE322 и подвергали отбору в отношении интеграции плазмид посредством выращивания в среде F12, дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки с 20 мкг пуромицина и 400 мкг/мл гигромицина, в течение 14 дней. Экспрессию hFcγRI индуцировали добавлением 1 мкг/мл доксициклина в культуральную среду на три дня. Дважды резистентные клетки инкубировали с 1 мг/мл IgG кролика в течение восемнадцати часов до окрашивания FITC-конъюгированным $F(ab')_2$-фрагментом козьего поликлонального антитела против IgG (Fcγ) мыши (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Клетки окрашивали в течение 1 часа, затем дважды промывали PBS перед анализом с помощью проточной цитометрии. Самые флуоресцирующие клетки (первые 5%) выделяли в виде пула и размножали в течение 10 дней, после чего протокол повторяли, но первый 1% самых флуоресцирующих клеток выделяли в виде пула. Этот пул размножали в течение 10 дней, после чего первые 0,1% самых флуоресцирующих клеток выделяли в виде отдельных клеток в 96-луночных планшетах. Клоны анализировали с помощью ELISA в отношении экспрессии антитела, и семь клонов были выбраны из 53 проанализированных клонов. Средняя удельная продуктивность этих клонов составляла 35 пг/клетку/день, и лучший клон экспрессировал рекомбинантное моноклональное антитело KD5 на уровне 54 пг/клетку/день.

Пример 10: Скрининги FASTR™, на которые не влияет уровень экспрессии CSCP

Для демонстрации того, что уровень экспрессии CSCP не влияет существенно на возможность выделения клеток, экспрессирующих связанный sPOI, сравнивали скрининги FASTR™ в отношении одного и того же sPOI в двух различных линиях клеток-хозяев, каждая из которых экспрессирует один и тот же CSCP, но или на высоком уровне, или на низком уровне.

Линия клеток-хозяев для FASTR™ RGC10 была выбрана для экспрессии белка hFcγRI на высоком уровне в результате

стабильной интеграции pTE158 и, как было уставлено, содержит 40 интегированных копий гена hFcγRI. Новую линию клеток, RS527, которая экспрессировала белок hFcγRI на более низком уровне, получали из CHO K1 после стабильной трансфекции и отбора в отношении интеграции одной копии гена. Клетки RS527 экспрессировали заметно меньше белка hFcγRI, чем клетки RGC10, как определено с помощью анализа с использованием Вестерн-блоттинга лизатов целых клеток линий клеток для FASTR™.

Вкратце, клетки RGC10 и RS527 трансфицировали pTE462, плазмидой, способной экспрессировать секретируемый слитый с hFc белок Rc1-hFc и придающей устойчивость к гигромицину. Трансфицированные культуры отбирали с помощью гигромицина в течение двух недель. Устойчивые к гигромицину клетки индуцировали с помощью 1 мкг/мл доксициклина (Dox) и блокировали с помощью IgG кролика в течение ночи, в соответствии со способом FASTR™, описанным здесь. На следующий день культуры RGC10/pTE462 и RS527/pTE462 окрашивали с использованием FITC-конъюгированного антитела, специфического в отношении hFc, а затем анализировали с помощью проточной цитометрии. Три ячейки R4, R5 и R6 с клетками, характеризующимися низким, средним и высоким уровнем флуоресценции, соответственно, были выбраны из каждой линии хозяина и размножены в культуре ткани.

Для сравнения уровня продукции белка Rc1-hFc из шести ячеек с клетками, шесть культур были инициированы, используя равное количество клеток в случае каждой ячейки. Спустя три дня собирали кондиционированные среды. Титры белков Rc1-hFc в кондиционированных средах определяли с помощью ELISA и наносили на график в зависимости от средней флуоресценции в соответствующих ячейках с клетками. В случае обеих линий клеток RGC10 и RS527, отмечалась схожая корреляция между средней флуоресценцией (количеством Rc1-hFc, представленным на клеточной поверхности), и уровнями продукции белка sPOI выделенных пулов клеток. Самое главное, что титры sPOI в двух ячейках R6 с высоким уровнем флуоресценции, происходящих от

RGC10 и RS527, были схожими. Эти данные показывают, что уровень экспрессии CSCP в линии клеток-хозяев для FASTR™ не влияет существенно на использование этого хозяина для выделения трансфицированных клеток на основе уровня экспрессии в sPOI.

Пример 11: Рецептор Tie2 в качестве захватывающего белка клеточной поверхности

Захватывающие белки клеточной поверхности (CSCP), отличные от FcγRI, могут использоваться в описываемых здесь способах. В этом примере рецептор Tie2 функционирует в качестве CSCP и используется для выделения клеток, экспрессирующих Tie-специфический слитый белок $ScFv_{C1b}$-Fc, полученный из моноклонального антитела C1b, которое специфически связывается с экстраклеточным доменом рецептора Tie2. Хотя CSCP в случае $ScFv_{C1b}$-Fc может быть hFcγRI, этот пример показывает, что Tie2 может также использоваться в качестве CSCP в случае $ScFv_{C1b}$-Fc.

Для создания линии клеток с индуцируемой экспрессией Tie2 в качестве CSCP, CHO K1 сначала стабильно трансфицировали содержащей TetR плазмидой pcDNA6/TR. Пул устойчивых к бластицидину клеток затем стабильно трансфицировали pTE259, плазмидой, которая делает возможной индуцируемую экспрессию белка, состоящего из экстраклеточного домена и трансмембранного домена Tie2. Индуцируемые клеточные клоны выделяли с помощью проточной цитометрии после окрашивания антителом, специфическим в отношении Tie2. Клон RGC54 был выбран для изучения годности FASTR™ для экспрессии $ScFv_{C1b}$-Fc.

Клетки RGC54 стабильно трансфицировали pTE988, плазмидой, способной экспрессировать секретируемый слитый с hFc белок $ScFv_{C1b}$-Fc и придающей устойчивость к гигромицину. Трансфицированную культуру отбирали с помощью гигромицина в течение двух недель. Устойчивые к гигромицину клетки индуцировали с помощью Dox и блокировали с использованием 1 мг/мл очищенного mAb C1b. Моноклональное антитело C1b было источником вариабельных областей в $ScFv_{C1b}$-Fc. На следующий день пул клеток окрашивали FITC-конъюгированным антителом, специфическим для hFc, а затем анализировали с помощью

проточной цитометрии. Три ячейки R6, R7 и R8 с клетками, характеризующимися низким, средним и высоким уровнем флуоресценции, соответственно, были выделены из каждой линии хозяина и размножены в культуре ткани. Три культуры были инициированы, используя равное количество клеток в случае каждой ячейки для определения продукции белка $ScFv_{C1b}$-Fc, как определено с помощью ELISA. Существовала корреляция между средней флуоресценцией (количеством $ScFv_{C1b}$-Fc, связывающегося с Tie2 на клеточной поверхности) и уровнями продукции белка $ScFv_{C1b}$-Fc в выделенных пулах клеток.

Эти данные показывают, что CSCP, отличные от hFcγRI, может служить в качестве CSCP, а также предполагают, что любой рецептор может быть преобразован в CSCP посредством удаления его цитоплазматического домена. Эти данные также показывают, что антиген может быть превращен в CSCP и использоваться для скрининга FASTR™ клеток, экспрессирующих антигенспецифическую, относящуюся к антителу молекулу.

Пример 12: Эффективные скрининги FASTR™ с использованием пар CSCP: sPOI с низким сродством

Ангиопоэтин-1 представляет собой лиганд для рецептора Tie2. Химерный белок, содержащий рецептор-связывающий домен ангиопоэтина-1 и hFc (FD1-hFc), связывается с Tie2 с константой связывания по сродству, составляющей 174 нМ, как определено с помощью BIAcore™. FD1-hFc и Tie2 были выбраны в качестве sPOI и CSCP, соответственно, для определения того, требуется ли минимальное сродство между CSCP и sPOI для скринингов FASTR™.

В экспериментах по «декорированию» клеток добавляемый извне FD1-hFc специфически связывался с клетками RGC54 через Tie2. Для определения того, является сродство между Tie2 и FD1-hFc достаточным для допуска скрининга FASTR™, клетки RGC54 стабильно трансфицировали pTE942, плазмидой, способной экспрессировать секретируемый слитый с hFc белок FD1-hFc и придающей устойчивость к гигромицину. Трансфицированные культуры отбирали с помощью гигромицина в течение двух недель. Устойчивые к гигромицину клетки индуцировали с помощью Dox и

блокировали с использованием 1 мг/мл очищенного FD1-mFc, включающего Fc IgG1 мыши. На следующий день пул клеток окрашивали FITC-конъюгированным антителом, специфическим для hFc, а затем анализировали с помощью проточной цитометрии. Три ячейки R6, R7 и R8 с клетками, характеризующимися высоким, средним и низким уровнем флуоресценции, соответственно, были выделены. Культуры были инициированы, используя равное количество клеток в случае каждой ячейки для определения уровней продукции белка FD1-hFc в кондиционированной среде, как определено с помощью ELISA. Существовала корреляция между средней флуоресценцией (связыванием FD1-Fc со связанным с клеточной поверхностью Tie2) и уровнями продукции белка FD1-hFc в выделенных пулах клеток. В ячейке с самым высоким уровнем флуоресценции продуцировалось больше всего FD1-hFc.

Эти данные показывают, что пара CSCP:sPOI с низким сродством (KD=174 нМ) может использоваться для эффективных скринингов FASTR™. Важно отметить, что $t_{1/2}$ диссоциации для связывания FD1-Fc : Tie2 составляет менее 2 минут, предполагая, что любая пара CSCP:sPOI с измеримым сродством может работать при скринингах FASTR™. Кроме того, этот эксперимент также показывает, что не являющийся FcγRI рецептор может использоваться в качестве CSCP для выделения клеток, экспрессирующих лиганд для него.

Пример 12: Слияние трансмембранного домена с ScFv создает функциональный CSCP

CSCP может быть любым связанным с поверхностью клетки белком, который обладает определяемым сродством к sPOI. Чтобы продемонстрировать это, полностью синтетический CSCP был сконструирован посредством слияния трансмембранного домена рецептора PDGF с ScFv, содержащим вариабельные области из мышиного, специфического в отношении каппа-цепи моноклонального антитела HB58. Хозяин для FASTR™, который экспрессирует этот химерный белок ($ScFv_{HB58}$-TM_{PDGFR}), был создан и использован для выделения клеток, экспрессирующих специфическое в отношении FD-домена антиопоэтина-2 антитело P12.

Линия клеток RS655, происходящая от CHO K1, конструктивно экспрессирует $ScFv_{HB58}$-TM_{PDGFR}. Клетки экспрессирующие $ScFv_{HB58}$-TM_{PDGFR}, могут быть окрашены путем последовательной инкубации с mAb P12, FD2-hFc, и FITC-конъюгированное антитело против hFc - P12, захваченное на клеточной поверхности с помощью ScFv HB58, детектировали по его сродству к FD2, которое в свою очередь определяли с помощью распознавания hFc-метки. Клетки RS656 были получены из клеток RS655 после стабильной трансфекции плазмидой, кодирующей ген eYFP. Почти 100% клеток RS656 были eYFP-положительными, и у большинства (76%) сохранялась экспрессия $ScFv_{HB58}$-TM_{PDGFR}, как определено по связыванию с FD2-hFc.

Клетки RS655 стабильно трансфицировали pTE693, плазмидой, способной экспрессировать тяжелые и легкие цепи антитела P12 и придающей устойчивость к пуромицину. Трансфицированную культуру отбирали с использованием пуромицина в течение двух недель с получением пула клеток, которые были неоднородными в отношении экспрессии mAb P12 (RS655/pTE693).

Для определения того, может ли $ScFv_{HB58}$-TM_{PDGFR}, функционировать в качестве CSCP и способствовать отделению клеток, продуцирующих антитела, от непродуцентов, равные количества клеток RS656 и клеток RS655/pTE693 были смешаны и подвергнуты сокультивированию. Когда P12, экспрессируемому в клетках RS655/pTE693, предоставляли возможность диффундировать и связываться с $ScFv_{HB58}$ на поверхности клеток RS656, большая популяция желтых клеток была также положительной по связыванию FD2-hFc. Однако, если $ScFv_{HB58}$ на поверхности RS656 был связан с избыточным количеством IgG мыши, то только не являющиеся желтыми клетки были положительными по связыванию FD2-hFc демонстрируя, что экспрессирующие клетки эффективно отделяются от не экспрессирующих клеток.

Эти данные показывают, что ScFv может быть превращен в функциональной CSCP посредством ориентации его на клеточную мембрану. Эти данные также показывают, что FASTR™ позволяет детектировать клетки, экспрессирующие секретируемое антитело, с помощью антигена, соответствующего антителу.

Пример 13: Представляющий интерес белок, включающий вариабельную область Т-клеточного рецептора

Основанный на проточной цитометрии способ захвата аутологичной секреции (FASTR™) для выделения экспрессирующих на высоком уровне клонов линии клеток, экспрессирующей представляющий интерес белок, которым является TCR-Fc, подготавливают аналогично приготовлению линии клеток, экспрессирующих представляющее интерес антитело. Клоны с высоким уровнем экспрессии идентифицируют посредством скрининга клеток, которые представляют на своей поверхности представляющий интерес TCR-Fc, связанный с hFcγR.

В этих примерах используют линию клеток CHO K1 RGC10, содержащих индуцируемый hFcγR1 в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности. Создают линию RGC10, которая экспрессирует рекомбинантные TCR-Fc, путем клонирования вариабельных областей TCR в рамке с Fc-областью человека, или непосредственно в рамке или с использованием линкерной последовательности между вариабельными областями TCR и Fc-областью человека.

Для создания представляющего интерес белка, который представляет собой димер, включающий связанный с Fc вариабельный домен α TCR и связанный с Fc вариабельный домен β TCR, RGC10 трансфицируют двумя векторами: первым вектором, способным экспрессировать слияние вариабельного домена α TCR с последовательностью Fc человека, и вторым вектором, способным экспрессировать слияние домена β TCR с той же последовательностью Fc человека. Каждый вектор включает лидерную последовательность (например, сигнальную последовательность секреции) 5' по отношению к вариабельной области TCR и селектируемый маркер, который представляет собой ген резистентности к лекарственному средству. После трансфекции каждым вектором клетки, содержащие вектор, отбирают путем отбора с использованием соответствующего лекарственного средства. Отбор приводит к линии клеток RGC10, содержащей как первый, и второй векторы. Клетки, экспрессирующие

представляющие интерес белки, можно детектировать с помощью одного или более из антитела против вариабельного домена β, антитела против вариабельного домена α и антитела против Fc-домена.

Для создания представляющего интерес белка, который представляет собой димер, включающий вариабельный домен как α, так и β TCR, слитый с Fc, RGC10 трансфицируют одним вектором, кодирующим представляющий интерес белок, который конструируют следующим образом: лидерная последовательность (например, сигнальная последовательность секреции), за которой следует вариабельный домен β TCR, слитый с линкером, который, в свою очередь, слит с вариабельным доменом α TCR, который, в свою очередь, слит с последовательностью Fc. В качестве альтернативы, один вектор может быть сконструирован следующим образом: лидерная последовательность (например, сигнальная последовательность секреции), за которой следует вариабельный домен α TCR, слитый с линкером, который, в свою очередь, слит с вариабельным доменом β TCR, который, в свою очередь, слит с последовательностью Fc. Клетки, экспрессирующие представляющие интерес белки, можно детектировать с помощью одного или более из антитела против вариабельного домена β, антитела против вариабельного домена α и антитела против Fc-домена.

Для создания представляющего интерес белка, описанного выше, который также включает константный домен α TCR и/или β TCR, вариабельный домен TCR (α или β) сливают с константным доменом TCR (например, вариабельный домен α TCR сливают с константным доменом α TCR, а вариабельный домен β TCR сливают с константным доменом β TCR), и вариабельный+константный домен TCR сливают непосредственно или через линкер к Fc-доменом. Клетки, экспрессирующие представляющие интерес белки, можно детектировать с помощью одного или более из антитела против вариабельного домена β, антитела против вариабельного домена α и антитела против Fc-домена.

Клетки, экспрессирующие желаемые количества TCR-Fc, выделяют, используя методику, которая использовалась при выделении описанных здесь 4SC622-продуцирующих клеточных линий, с использованием одного или более из антитела против вариабельного домена α, антитела против вариабельного домена β, антитела против константного домена α, антитела против константного домена β и антитела против Fc-домена. Клетки, экспрессирующие TCR-Fc на самых высоких уровнях, выбирают в качестве TCR-Fc-продуцирующих клеточных линий.

Пример 14: CSCP на основе ScFv для выделения нескольких изотипов IgG и биспецифических антител

Генетически модифицированных мышей, у которых VDJ-сегмент, кодирующий фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулина, и VJ-сегмент, кодирующий фрагмент легкой цепи каппа иммуноглобулина, их геномов были заменены ортологами у человека (т.е. мышей Velocimmune®, см. патент США № 7105348, который включен сюда посредством ссылки в его полном объеме) иммунизировали либо Fc-фрагментом белка IgG4 человека (hFc, или просто Fc; SEQ ID NO: 26), либо полипептидом ΔAdpFc человека, содержащим дипептидную мутацию (H95R, Y96F в соответствии с IMGT; также известным как Fc*; SEQ ID NO: 42). Моноклональные антитела были получены от мышей и подвергнуты скринингу в отношении их способности к связыванию с Fc, Fc* или антителами, включающими Fc и/или Fc*. Три антитела, способные связываться с Fc (Ab1, Ab2, Ab3), и три, которые были способны связываться с Fc* (Ab4, Ab5, Ab6), были проверены на их способность связывать молекулы, имеющие один из следующих форматов: Fc/Fc, Fc/Fc* (который может быть биспецифическим антителом) и Fc/Fc*.

Измерения для определения сродства связывания и кинетических констант были сделаны на инструменте Biacore 2000. Антитела (каждое из Ab1-Ab8) были захвачены на поверхность сенсора с антителом против Fc мыши (формат захвата мАb), и гомодимеры Fc человека (SEQ ID NO: 26), гомодимеры Fc* человека (SEQ ID NO: 42) или гетеродимеры Fc/Fc* пропускали по поверхности. Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и

диссоциации (k_d) определяли посредством обработки и подгонки данных к модели связывании в соотношении 1:1, используя программное обеспечение для вычерчивания кривой по точкам Scrubber 2.0. Константы равновесия при диссоциации (K_D) и полупериод диссоциации ($t_{1/2}$) рассчитывали, исходя из кинетических констант скорости, как представлено далее: K_D (M)=k_d/k_a; и $t_{1/2}$ (мин)=(ln2/(60*kd). Как показано в таблице 2, антитела были трех различных категорий: Fc-специфическими, Fc*-специфическими и теми, которые не демонстрируют различие между Fc и Fc* (не специфическими). Fc-специфические антитела были зависимыми от аминокислот His 95 и/или Tyr 96, поскольку эти антитела не связываются с Fc* человека с дипептидной мутацией (H95R, Y96F) в нем. Напротив, Fc*-специфические антитела были зависимыми от Arg 95 и/или Phe 96, поскольку эти антитела не связываются с Fc человека дикого типа.

Пример 15: Линии клеток, продуцирующие Ab2 и слитый белок ScFv-FcγR, происходящий от Ab2

Были секвенированы тяжелая цепь и легкая цепь Fc-специфического Ab2. Для получения рекомбинантного антитела Ab2 был сконструирован экспрессионный вектор в виде плазмиды, кодирующий тяжелую цепь, и был сконструирован экспрессионный вектор в виде плазмиды, кодирующий легкую цепь. Оба вектора допускают экспрессию и секрецию соответствующих субъединиц в клетке CHO. Для экспрессии антитела обе плазмиды трансфицировали в клетку CHO-K1, и были выделены стабильные трансформанты. Экспрессия цепей антител находилась под контролем конститутивного промотора CMV.

Таблица 2

Сродство антител - исследования с использованием поверхностного плазмонного резонанса

Антитело	POI-мишень	ka (M^{-1} $сек^{-1}$)	kd ($сек^{-1}$)	KD (M)	t ½ (мин)	Специфичность
Ат 1	Fc/Fc	1.07E+05	3.79E-04	3.54E-09	30	Fc
	Fc/Fc*	8.16E+04	3.01E-04	3.69E-09	38	
	Fc*/Fc*	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	
Ат 2	Fc/Fc	7.86E+04	3.50E-05	4.45E-10	330	Fc
	Fc/Fc*	5.45E+04	1.00-06	1.84E-11	11550	
	Fc*/Fc*	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	
Ат 3	Fc/Fc	1.77E+05	4.08E-02	2.30E-07	0.3	Fc
	Fc/Fc*	4.51E+04	2.60E-02	5.77E-07	0.4	
	Fc*/Fc*	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	
Ат 4	Fc/Fc	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	Fc*
	Fc/Fc*	6.00E+03	1.00E-06	2.00E-10	11550	
	Fc*/Fc*	2.22E+04	9.56E-06	4.50E-10	1209	
Ат 5	Fc/Fc	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	Fc*
	Fc/Fc*	3.11E+05	1.00E-06	3.21E-12	11550	
	Fc*/Fc*	5.57E+05	1.00E-06	1.79E-12	11550	
Ат 6	Fc/Fc	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	Fc*
	Fc/Fc*	4.48E+05	7.43E-04	1.66E-09	16	
	Fc*/Fc*	8.73E+05	5.93E-04	6.79E-10	19	
Ат 7	Fc/Fc	6.02E+05	2.42E-04	4.02E-10	48	Не специфич.
	Fc/Fc*	4.90E+05	2.15E-04	4.39E-10	54	
	Fc*/Fc*	4.46E+05	3.20E-02	7.18E-08	0.4	
Ат 8	Fc/Fc	2.59E+05	4.88E-04	1.88E-09	24	Не специфич.
	Fc/Fc*	1.88E+05	4.02E-04	2.14E-09	29	
	Fc*/Fc*	4.10E+04	3.90E-02	9.60E-07	0.3	

Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи были использованы для разработки захватывающей молекулы поверхности, включающей ScFv против Fc. Для получения нуклеиновой кислоты, кодирующей захватывающую молекулу клеточной поверхности ScFv-FcγR против Fc, происходящую от Ab2, аминокислотные последовательности вариабельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина Ab2 (SEQ ID NO: 15) и вариабельного домена легкой цепи иммуноглобулина Ab2 (SEQ ID NO: 16) были обратно переведены в нуклеотидные последовательности и подвергнуты оптимизации в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетках CHO. Так же, С-концевая часть FcγRI человека была подвергнута оптимизации в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетках CHO. Оптимизированные в отношении частоты использования кодонов нуклеотидные последовательности амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции и лигировали с образованием непрерывной последовательности нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 20), которая кодирует слитый белок ScFv-FcγR с SEQ ID NO: 19.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок ScFv-FcγR-TM-cyto, встраивали в экспрессионный вектор, используя стандартную ПЦР и методы клонирования с использованием эндонуклеаз рестрикции. Полученная замкнутая в круг плазмида, проиллюстрированная в SEQ ID NO: 23, включает кодирующую бета-лактамазу последовательность нуклеиновой кислоты и два оперона. Первый оперон включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую желтый флуоресцентный белок (YFP), вариант зеленого флуоресцентного белка, в рамке с маркером устойчивости к неомицину, под контролем промотора SV40 (например, SEQ ID NO: 24). Второй оперон, который является наиболее важной частью вектора для целей этого аспекта изобретения, включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую кодон-оптимизированный слитый белок ScFv-FcγR, под контролем промотора hCMV-IE и интрон hCMV (например, SEQ ID NO: 25).

Клетки CHO-K1 трансфицировали плазмидой SEQ ID NO: 23. Были выделены стабильные интегранты, которые интегрировали линейную конструкцию SEQ ID NO: 22 в свои геномы.

Замкнутая в круг плазмида содержит два Lox-сайта, фланкирующие первый оперон и второй оперон, чтобы обеспечить интеграцию этих оперонов в виде линейной конструкции в геном клетки-хозяина. Линейная конструкция, простирающаяся от первого Lox-сайта до второго Lox-сайта, иллюстрируется в SEQ ID NO: 22 и включает от 5′ к 3′: промотор SV40, нуклеиновую кислоту, кодирующую устойчивость к неомицину, IRES, нуклеиновую кислоту, кодирующую eYFP, последовательность полиаденилирования SV40, промотор hCMV-IE, интрон hCMV, последовательность Tet-оператора (для контролируемой экспрессии слитого белка ScFv-FcγR-TM-cyto), кодирующую сигнальную последовательность mROR нуклеиновую кислоту, нуклеиновую кислоту, кодирующую ScFv Ab2, нуклеиновую кислоту, кодирующую трансмембранную и цитоплазматическую часть FcγR (SEQ ID NO: 21), и последовательность полиаденилирования SV40.

Пример 16: Целевые объекты захвата на поверхности с помощью ScFv-FcγR-TM-cyto

Клетки CHO-K1, содержащие интегрированную последовательность SEQ ID NO: 22, трансфицировали плазмидами, которые кодируют антитела различных подтипов, например, IgG1, IgG2, IgG4, биспецифическое антитело подтипа IgG4, содержащее один CH3-домен с двумя заменами 95R/435R - 96F/436F, в то время как другой CH3-домен является доменом дикого типа (Fc/Fc* IgG4), и биспецифическое антитело подтипа IgG1 формата Fc/Fc* IgG1. Клетки обрабатывали доксициклином для вызова продукции захватывающей молекулы вместе с антителом. После коэкспрессии антитела и захватывающей молекулы, клетки в некоторых случаях обрабатывали hFc-блокирующим белком и детекторной молекулой (FITC-меченным антителом против hFab). В таблице 3 суммированы результаты, и в общем показано, что слитый белок для захвата на поверхности ScFv-FcγR связывает молекулы IgG4, IgG2 и IgG1, в то время как включающая FcγR дикого типа захватывающая молекула поверхности связывает IgG1, но не IgG4 или IgG2.

Таблица 3

Анализы конкуренции с использованием блокирующей молекулы

	Произвольные FITC единицы (с hFc-блокирующей молекулой или без нее) - Способ					Замена hFc?
Антитело	Без hFc	hFc (1 ч)	hFc (2 ч)	hFc (20 ч)	Без покрытия	
	Захватывающая молекула = ScFv-FcγR-TM-cyto Детекторная молекула = FITC-меченное антитело против hFab					
IgG1 mAb-3	250	120	80	20	10	Да
IgG4 mAb-4	250	100	55	20	10	Да
IgG4 mAb-5	250	70	40	20	10	Да
IgG2 mAb-6	200[1]	Нет данных	ND	ND	12[2]	Да
	Захватывающая молекула = hFcγR Детекторная молекула = FITC-меченное антитело против hFab					

IgG1 mAb-3	300	80	30	9	3,5	Да
IgG4 mAb-4	100	2	2	2	2	Нет
IgG4 mAb-5	35	5	5	5	5	Нет

[1] + Dox

[2] - Dox

Пример 17: Линии клеток, продуцирующие Ab6 и происходящий от Ab6 ScFv*-FcγR-TM-cyto

Были секвенированы тяжелая цепь и легкая цепь Fc*-специфического Ab6. Аминокислотной последовательностью легкой цепи, как установлено, является SEQ ID NO: 41. Аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, как установлено, является SEQ ID NO: 40. Для получения рекомбинантного антитела Ab6 был сконструирован экспрессионный вектор в виде плазмиды, кодирующий тяжелую цепь, и был сконструирован экспрессионный вектор в виде плазмиды, кодирующий легкую цепь. Для экспрессии антитела обе плазмиды трансфицировали в клетку CHO-K1, были выделены стабильные трансформанты, и экспрессия находилась под контролем конститутивного промотора CMV.

Для получения нуклеиновой кислоты, кодирующей захватывающую молекулу клеточной поверхности ScFv*-FcγR, происходящую от Ab6 и специфичную к Fc*, аминокислотные последовательности вариабельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина антитела Ab6 (SEQ ID NO: 38) и вариабельного домена легкой цепи иммуноглобулина Ab6 (SEQ ID NO: 39) были обратно переведены в нуклеотидные последовательности и подвергнуты оптимизации в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетках CHO. Так же, C-концевая часть FcγRI человека (SEQ ID NO: 21) была подвергнута оптимизации в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетках CHO. Оптимизированные в отношении частоты использования кодонов нуклеотидные последовательности амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции и лигировали с образованием непрерывной последовательности нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 45), которая кодирует слитый белок ScFv*FcγR против Fc* (SEQ ID NO: 43).

Нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок ScFv*-FcγR-TM-cyto, встраивали в экспрессионный вектор, используя стандартную ПЦР и методы клонирования с использованием эндонуклеаз рестрикции. Полученная замкнутая в круг плазмида, проиллюстрированная в SEQ ID NO: 44, включает кодирующую бета-лактамазу последовательность нуклеиновой кислоты и два оперона. Первый оперон включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую желтый флуоресцентный белок (YFP), вариант зеленого флуоресцентного белка, в рамке с маркером устойчивости к неомицину, под контролем промотора SV40 (например, SEQ ID NO: 46). Второй оперон, который является наиболее важной частью вектора для целей этого аспекта изобретения, включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую кодон-оптимизированный слитый белок ScFv-FcγR против Fc*, под контролем промотора hCMV-IE и интрон hCMV (например, SEQ ID NO: 47).

Клетки CHO-K1 трансфицировали плазмидой SEQ ID NO: 44. Были выделены стабильные интегранты, которые интегрировали линейную конструкцию SEQ ID NO: 48.

Замкнутая в круг плазмида содержит два Lox-сайта, фланкирующие первый оперон и второй оперон, чтобы обеспечить интеграцию этих оперонов в виде линейной конструкции в геном клетки-хозяина. Линейная конструкция, простирающаяся от первого Lox-сайта до второго Lox-сайта, иллюстрируется в SEQ ID NO: 48 и включает от 5′ к 3′: промотор SV40, нуклеиновую кислоту, кодирующую устойчивость к неомицину, IRES, нуклеиновую кислоту, кодирующую eYFP, последовательность полиаденилирования SV40, промотор hCMV-IE, интрон hCMV, последовательность Tet-оператора (для контролируемой экспрессии слитого белка ScFv* против Fc*-FcγR), кодирующую сигнальную последовательность mROR нуклеиновую кислоту, нуклеиновую кислоту, кодирующую ScFv*, происходящий от Ab6 и специфичный к Fc*, нуклеиновую кислоту, кодирующую трансмембранный и цитоплазматический домен - полипептид FcγR (SEQ ID NO: 21), и последовательность полиаденилирования SV40.

Пример 18: Сортировка биспецифических антител

Захват с использованием направленной против Fc молекулы и детектирование с использованием антитела против Fc*

Система захвата на поверхности на основе ScFv-FcγR, происходящего от Ab2 и специфичного к Fc, была проверена на ее способность обнаруживать и обогащать в отношении клетки(ок), которые продуцируют биспецифические антитела. Для оценки способности детектировать биспецифические антитела, которые содержат замену 95R/435R-96F/436F в одном из CH3-доменов (названном Fc*), были экспрессированы различные антитела в линии клеток с захватывающей молекулой ее поверхности в виде белка ScFv-FcγR, происходящего от Ab2 и специфичного к Fc, используя hFc в качестве блокирующей молекулы, и FITC-меченное антитело против Fc* Ab6 (например, mAb с HC с SEQ ID NO: 40, и LC с SEQ ID NO: 41) в качестве детекторной молекулы. Линия клеток с захватывающей молекулой на ее поверхности в виде белка ScFv-FcγR, происходящего от Ab2 и специфичного к Fc, была способна детектировать и отличать биспецифическое антитело (Fc/Fc*) от любых моноспецифических антител Fc*/Fc* или Fc/Fc, используя Fc*-специфическое антитело Ab6 в качестве детекторной молекулы (таблица 4). Линия клеток с захватывающей молекулой на ее поверхности в виде белка FcγR дикого типа не была способна провести различие между видами Fc/Fc*, Fc*/Fc* и Fc/Fc IgG4, поскольку FcγR не может связывать или связывается с очень низким сродством к IgG4.

Захват с использованием направленной против Fc* молекулы и детектирование с использованием антитела против Fc

С другой стороны, система захвата на поверхности на основе ScFv*-FcγR, происходящего от Ab6 и специфичного к Fc*, была проверена на ее способность обнаруживать и обогащать в отношении клетки(ок), которые продуцируют биспецифические антитела. Для оценки способности детектировать биспецифические антитела, которые содержат замену 95R/435R-96F/436F в одном из CH3-доменов (названном Fc*), были экспрессированы различные антитела в линии клеток с захватывающей молекулой на ее

поверхности в виде белка ScFv*-FcγR, происходящего от Ab6 и специфичного к Fc*, используя hFc в качестве блокирующей молекулы, и Alexa 488-меченное антитело против Fc Ab2, которое распознает не замещенный CH3, в качестве детекторной молекулы. Линия клеток с захватывающей молекулой на ее поверхности в виде белка происходящий от Ab6 анти-Fc*-специфический ScFv*-FcγR была способна детектировать и отличать биспецифическое антитело (Fc/Fc*) от любых моноспецифических антител Fc*/Fc* или Fc/Fc, используя Fc-специфическое антитело Ab2 в качестве детекторной молекулы (таблица 4). Линия клеток с захватывающей молекулой на ее поверхности в виде FcγR не была способна провести различие между видами Fc/Fc*, Fc*/Fc* и Fc/Fc IgG4.

Таблица 4

Детектирование биспецифических антител - средняя интенсивность флуоресценции (MFI)

		IgG1			IgG4			
[1]CSCP	[2]DM	Fc/Fc*	Fc*/Fc*	Fc/Fc	Fc/Fc*	Fc*/Fc*	Fc/Fc	Специфичность в отношении Fc/Fc*
FcγR	Ab2	500	Нет данных	350	200	200	200	НЕТ
	Ab6	200	200	200	Нет данных	Нет данных	Нет данных	НЕТ
	Анти-hFc	1800	Нет данных	1000	Нет данных	Нет данных	Нет данных	НЕТ
ScFv-FcγR	Ab6	500	15	15	500	15	15	ДА
	Анти-hFc	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
ScFv*-FcγR	Ab2	150	10	10	Нет данных	Нет данных	Нет данных	ДА
	Анти-hFc	200	Нет данных	10	Нет данных	Нет данных	Нет данных	ДА

[1] Захватывающий белок клеточной поверхности

[2] Детекторная молекула

Пример 19: Обогащение в отношении Fc/Fc* биспецифических антител

Для оценки способности систем (происходящих от Ab2) ScFv-FcγR в качестве CSCP/антитело против Fc* (Ab6) в качестве DM (детекторной молекулы) и (происходящий от Ab6) ScFv*-FcγR в качестве CSCP/антитело против Fc (Ab2) в качестве DM к сортировке и обогащению биспецифических антител, линии клеток, коэкспрессирующие моноклональное антитело Fc/Fc* IgG4 (IgG4-мАт-2) и слитый белок ScFv-FcγR против Fc, используя hFc в качестве блокирующей молекулы и FITC-меченное антитело против Fc* (Ab6) в качестве детекторной молекулы, были подвергнуты серийной сортировке клеток с возбуждением флуоресценции и объединению для обогащения в отношении продукции видов Fc/Fc*. Клетки, вырабатывающие Fc/Fc*, из пулов пятой и шестой серии были проанализированы на титр антител в целом и титры антител каждого формата: Fc/Fc*, Fc/Fc и Fc*/Fc*. Поскольку клетки кодируют как тяжелую цепь, кодирующую не замещенный CH3-домен («Fc», т.е. включающий гистидин в положении 95 в соответствии с IMGT и тирозин в положении 96 в соответствии с IMGT), так и тяжелую цепь, кодирующей замещенный CH3-домен («Fc*», т.е. включающий аргинин в положении 95 в соответствии с IMGT и фенилаланин в положении 96 в соответствии с IMGT), согласно чисто математическому анализу с использованием решетки Пеннетта, клетка теоретически будет продуцировать 25% Fc/Fc, 50% Fc/Fc* и 25% Fc*/Fc*. Биологически, однако, можно было бы ожидать (предварительное обогащение), что большая часть продуцированного антитела будет Fc/Fc.

Как показано в таблице 5, клетки, отобранные, объединенные и обогащенные в отношении продукции биспецифических антител, продуцировали вплоть до 49% видов Fc/Fc*, с титрами Fc/Fc* биспецифических антител, составляющими по меньшей мере приблизительно 3,2 г/л.

Таблица 5

Обогащение в отношении Fc/Fc* биспецифического антитела IgG4-мАт-2

		Fc/Fc*		Fc/Fc		Fc*/Fc*	
Пул	Линия клеток	Титр (г/л)	%	Титр (г/л)	%	Титр (г/л)	%
5	1	1,2	28	2,2	50	0,99	23
	2	1,9	**49**	1,3	32	0,73	19
	3	1,5	47	1,2	40	0,40	13
	4	1,6	37	1,3	31	1,3	32
	5	1,5	48	1,1	35	0,58	18
	6	1,8	47	1,3	33	0,75	20
6	7	2,6	44	2,0	34	1,3	23
	8	**3,2**	42	2,4	31	2,0	27
	9	2,1	45	1,5	33	1,0	22
	10	2,8	43	2,0	31	1,7	28
	11	2,3	44	1,6	31	1,3	24

Хотя предшествующее изобретение было описано довольно подробно с целью иллюстрации и примера, специалистам со средним уровнем компетентности в данной области техники будет очевидно, что определенные изменения и модификации могут быть внесены в идеи изобретения, не отступая от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ детектирования и выделения клеток, которые продуцируют биспецифическое антитело на высоких уровнях, включающий:

(a) трансфекцию клеток нуклеиновой кислотой, которая кодирует захватывающий белок клеточной поверхности (CSCP), который представляет собой слитый белок, включающий мембранный якорный домен, и способен связывать первую субъединицу гетеродимерного белка, причем клетка экспрессирует биспецифическое антитело, где биспецифическое антитело содержит множество субъединиц, и первый сайт в биспецифическом антителе находится в первой субъединице, содержащей тяжелую цепь, содержащую CH3-домен дикого типа, имеющий остаток гистидина в положении 95 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT и остаток тирозина в положении 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT, и второй сайт в биспецифическом антителе находится во второй субъединице, содержащей тяжелую цепь, содержащую замещенный CH3-домен, имеющий остаток аргинина в положении 95 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT и остаток фенилаланина в положении 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT, где CSCP содержит ScFv, способное связываться с первой субъединицей, но не со второй субъединицей биспецифичного антитела, и где (i) CSCP связывается с первым сайтом в биспецифическом антителе, образуя комплекс CSCP-биспецифическое антитело внутри клетки-хозяина, (ii) комплекс CSCP-биспецифическое антитело переносится через клетку-хозяина и (iii) затем представляется на поверхности клетки-хозяина;

(b) детектирование клетки со стадии (a), которая экспрессирует указанный CSCP с высоким выходом;

(c) выделение и культивирование клетки, которая экспрессирует CSCP с высоким выходом;

(d) детектирование биспецифического антитела на поверхности выделенной и подвергнутой культивированию клетки из стадии (c) с помощью детекторной молекулы, которая связывает второй сайт в биспецифическом антителе, где детекторная молекула содержит рекомбинантный антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с замещенным CH3-доменом, имеющим остаток аргинина в положении 95 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT и остаток фенилаланина в положении 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT; и

(e) выделение клетки, детектированной на стадии (d), которая содержит детектированное биспецифичное антитело на своей поверхности.

2. Способ детектирования или выделения клеток, которые стабильно экспрессируют биспецифическое антитело, имеющее первую субъединицу и вторую субъединицу, при этом способ включает стадии:

(a) экспрессии в клетке-хозяине:

(i) захватывающего белка клеточной поверхности (CSCP), содержащего антиген-связывающий белок и мембранный якорный домен, и

(ii) биспецифического антитела, где биспецифическое антитело содержит множество субъединиц, и первый сайт в биспецифическом антителе находится в первой субъединице, содержащей тяжелую цепь, содержащую CH3-домен дикого типа, имеющий остаток гистидина в положении 95 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT и остаток тирозина в положении 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT, и второй сайт в биспецифическом антителе находится во второй субъединице, содержащей тяжелую цепь, содержащую замещенный CH3-домен, имеющий остаток аргинина в положении 95 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT и остаток фенилаланина в положении 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT, где CSCP содержит ScFv, способное связываться с первой субъединицей, но не со второй субъединицей биспецифичного антитела, и

где (i) CSCP связывается с первым сайтом в биспецифическом антителе, образуя комплекс CSCP-биспецифическое антитело внутри клетки-хозяина, (ii) комплекс CSCP-биспецифическое антитело переносится через клетку-хозяина и (iii) затем представляется на поверхности клетки-хозяина;

(b) приведения клетки-хозяина в контакт с детекторной молекулой, где детекторная молекула связывается со вторым сайтом в биспецифическом антителе, где детекторная молекула содержит рекомбинантный антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с замещенным CH3-доменом, имеющим остаток аргинина в положении 95 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT и остаток фенилаланина в положении 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT; и

(c) отбор клетки-хозяина, которая связывается с детекторной

молекулой.

3. Способ по п. 1 или 2, где биспецифическое антитело содержит биспецифическое антитело, Fc-содержащий слитый белок или TCR-Fc.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, где CSCP содержит рекомбинантный антигенсвязывающий белок, который связывается с Fc-доменом IgG1 человека, Fc-доменом IgG2 человека или Fc-доменом IgG4 человека.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, где способ включает приведение клетки в контакт с блокирующей молекулой, где блокирующая молекула связывается с CSCP, который не связан с биспецифическим антителом, но не связывается с комплексом CSCP-биспецифическое антитело.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, где клетка детектируется и отбирается с помощью сортировки клеток с возбуждением флуоресценции.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, где детекторная молекула (DM) содержит меченый рекомбинантный антигенсвязывающий белок, который связывается с Fc-доменом IgG1 человека, Fc-доменом IgG2 человека или Fc-доменом IgG4 человека, где Fc-домен имеет остаток аргинина в положении 95 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT и остаток фенилаланина в положении 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT.

8. Способ по любому из пп. 1-6, где:

(a) антигенсвязывающий белок содержит антитело или ScFv, которое связывается с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42;

(b) антигенсвязывающий белок содержит антитело или ScFv, которое связывается с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42 с KD менее чем приблизительно 60 нМ, как определено в анализе с использованием поверхностного плазмонного резонанса; или

(c) антигенсвязывающий белок представляет собой антитело или ScFv, которое связывается с тем же эпитопом в замещенном CH3-полипептиде, что и антитело, которое включает CDR-1 тяжелой цепи (HCDR-1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, HCDR-2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, HCDR-3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, CDR-1 легкой цепи (LCDR-1), имеющий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 35, LCDR-2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и LCDR-3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

9. Способ по п. 8, где:

(a) антигенсвязывающий белок детекторной молекулы содержит один или более определяющих комплементарность участков (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 38, или вариабельной области тяжелой цепи (LCVR), имеющей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 39;

(b) антигенсвязывающий белок детекторной молекулы содержит CDR-1 тяжелой цепи (HCDR-1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, HCDR-2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, HCDR-3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, CDR-1 легкой цепи (LCDR-1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, LCDR-2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и LCDR-3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37;

(c) антигенсвязывающий белок детекторной молекулы содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей степени на 95% идентична SEQ ID NO: 38, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 39;

(d) антигенсвязывающий белок детекторной молекулы содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39;

(e) антигенсвязывающий белок детекторной молекулы представляет собой антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 40, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 41; или

(f) антигенсвязывающий белок детекторной молекулы представляет собой антитело, которое содержит тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 40, и легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 41.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, где антигенсвязывающий белок детекторной молекулы представляет собой

слитый с ScFv белок, содержащий:

(a) (i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 38, (ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 39, и (iii) мембранный якорный домен;

(b) вариабельный домен тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 38, и вариабельный домен легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 39; или

(c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

11. Способ по п. 1 или 2, где биспецифическое антитело и захватывающий белок клеточной поверхности (CSCP) рекомбинантно экспрессируются в виде слитого белка.

12. Большое количество очищенного биспецифического антитела, полученного способом по п. 1 или 2, где клетка представляет собой клональную клеточную линию, идентифицированную способом, включающим:

(a) трансфекцию множества клеток (i) последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей биспецифическое антитело, и (ii) последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей захватывающий белок клеточной поверхности (CSCP);

(b) культивирование множества клеток в условиях, в которых биспецифическое антитело и CSCP экспрессируются внутриклеточно в одной клетке и обнаруживаются вместе на одной и той же клеточной поверхности;

(c) идентификацию указанной одной клетки из множества трансфицированных клеток путем приведения множества трансфицированных клеток в контакт с детекторной молекулой (DM), которая связывает биспецифическое антитело, CSCP или оба;

(d) культивирование множества клональных клеток, которые идентичны указанной одной клетке, в культуральной среде и в условиях, которые обеспечивают экспрессию биспецифического антитела; где биспецифическое антитело секретируется указанными клональными клетками в культуральную среду; и

(e) очистка биспецифического антитела из культуральной среды.

13. Композиция, содержащая биспецифическое антитело, полученное способом по п. 1 или 2, где биспецифическое антитело

получают посредством клональной клеточной линии, которую идентифицируют способом, включающим:

(a) трансфекцию множества клеток (i) последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей биспецифическое антитело, и (ii) последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей захватывающий белок клеточной поверхности (CSCP);

(b) культивирование множества клеток в условиях, в которых биспецифическое антитело и CSCP экспрессируются внутриклеточно в одной клетке и обнаруживаются вместе на одной и той же клеточной поверхности;

(c) идентификацию указанной одной клетки из множества трансфицированных клеток путем приведения множества трансфицированных клеток в контакт с детекторной молекулой (DM), которая связывается с биспецифическим антителом;

(d) культивирование множества клональных клеток, полученных посредством указанной одной клетки в культуральной среде и в условиях, которые обеспечивают экспрессию биспецифического антитела; где биспецифическое антитело секретируется в культуральную среду; и

(e) получение биспецифического антитела из культуральной среды и добавление фармацевтически приемлемого эксципиента.

По доверенности

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202190266

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C07K 16/18 *(2006.01)*
C07K 16/22 *(2006.01)*
C07K 16/42 *(2006.01)*
C12N 15/10 *(2006.01)*
G01N 33/50 *(2006.01)*
G01N 33/68 *(2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C07K 16/18, 16/22, 16/42, C12N 15/10

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y A	WO 02/057423 A2 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. et al.) 25.07.2002, реферат, страница 7, строки 15-29, страница 8, строка 17-страница 9, строки 5, 12-страница 11, строка 25, страница 22, строки 12-23, страница 25, строка 20-страница 26, строка 15, примеры, формула	1-7 8-13
Y	US 7435553 B2 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 14.10.2008, реферат, колонка 4, строки 2-58, колонка 5, строки 20-67, колонка 7, строка 10-колонка 8, строка 56, примеры, формула	1-7
Y	US 2010/0331527 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 30.12.2010, реферат, параграфы [0024]-[0027], [0040]-[0046], [0050]-[0053], [0073]-[0089], [0105]-[0126], [0140]-[0149], формула	1-7

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«A» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«T» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **30/06/2021**

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

Документ подписан электронной подписью
Сертификат: 1602592177464
Владелец: CN=Рогожин
Действителен: 13.10.2020-13.10.2021

Д.Ю. Рогожин